

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 337**

51 Int. Cl.:

A01N 37/44	(2006.01)
A01N 63/00	(2010.01)
A01P 3/00	(2006.01)
A01N 63/34	(2010.01)
A01N 63/38	(2010.01)
A01N 63/30	(2010.01)
A01N 63/32	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2020 PCT/EP2020/064313**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2020 WO20239633**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2020 E 20726170 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2024 EP 3962273**

54 Título: **Composición y método para mejorar la germinación de esporas y la eficacia biológica**

30 Prioridad:

24.05.2019 EP 19176596

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

19.06.2024

73 Titular/es:

**DANSTAR FERMENT AG (100.0%)
Poststrasse 30
6300 Zug, CH**

72 Inventor/es:

**ROGALSKA, SELMA y
GOBLE, TARRYN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 973 337 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición y método para mejorar la germinación de esporas y la eficacia biológica

5 **Campo tecnológico**

La presente divulgación se refiere a composiciones y métodos para mejorar la capacidad de una población de agentes biológicos o agentes de control biológico para competir y sobrevivir en un campo.

10 **Antecedentes**

El uso de organismos naturales, tales como bacterias, virus y hongos para el control de plagas y enfermedades es de gran interés. En particular, los hongos son organismos con gran potencial como agentes de control biológico porque tienen una capacidad reproductiva extremadamente alta, un tiempo de generación corto y, a veces, son muy específicos en su acción, atacando solo al hospedador con el que han coevolucionado. Además, los hongos tienen fases saprofitas en las que pueden sobrevivir sin el hospedador y permanecer en el medio ambiente hasta que el hospedador vuelve a aparecer.

Se han usado soluciones biológicas, entre otras cosas, para estimular el crecimiento de las plantas, combatir los patógenos de las plantas, reducir el uso de productos químicos para la fertilización del suelo y el manejo de plagas, y aumentar la disponibilidad y absorción de nutrientes por parte de la planta. Se reconoce que el uso de estos agentes químicos sintéticos está asociado con problemas tales como efectos inespecíficos, contaminación ambiental, problemas de salud humana, así como los elevados costes económicos que conlleva. Sin embargo, tales agentes químicos continúan siendo de uso generalizado debido a su fuerte actividad contra importantes enfermedades fúngicas y la disponibilidad limitada de alternativas ambientalmente más seguras y eficaces. Con la creciente conciencia de los efectos nocivos de muchos plaguicidas químicos sintéticos en el medio ambiente en su conjunto, ha habido un cambio en la atención hacia la investigación y el desarrollo de métodos de control de plagas y enfermedades más respetuosos con el medio ambiente.

El documento EP3467097A1 describe el uso de composiciones que contienen *Streptomyces melanosporofaciens* AGL225 para controlar enfermedades de las plantas. Cabrefiga, J., *et al.* Applied and Environmental Microbiology 77.10 (2011): 3174-3181 describen la mejora de la eficacia de un agente de biocontrol del fuego bacteriano mediante una mejora nutricional combinada con osmoadaptación. Cabrefiga, J., *et al.* Journal of applied microbiology 117.4 (2014): 1122-1131 describe la mejora de una formulación seca de *Pseudomonas fluorescens* EPS62e para el biocontrol de la enfermedad del fuego bacteriano mediante la combinación de osmoadaptación del cultivo con un lioprotector de liofilización. El documento US 2016/183537 describe composiciones que contienen *Bacillus amyloliquefaciens* RTI472 para beneficiar el crecimiento de las plantas y tratar enfermedades de las plantas.

Desafortunadamente, las soluciones biológicas a veces pueden ser limitadas, por ejemplo, en su capacidad para colonizar tejido vegetal o sobrevivir en condiciones de campo. Por lo tanto, los esfuerzos para aplicar determinados organismos biológicos vivos se han visto limitados por la capacidad insuficiente de estos microorganismos biológicos para germinar sobre sustratos de fuente de carbono mínimos (por ejemplo, un tejido vegetal después de la aplicación de un organismo de control biológico). Al permanecer en el estado de esporas inactivas, tales microorganismos biológicos son incapaces de realizar sus modos de acción beneficiosos. Una mayor germinación de tales esporas o conidios permitiría a los organismos recuperar la actividad metabólica y, por lo tanto, aumentar la eficacia de estas soluciones biológicas colonizando el tejido vegetal. Esta mayor tasa de germinación también puede prevenir la inactivación o reducción por factores abióticos. Por lo tanto, existe una necesidad en el estado de la técnica de desarrollar una solución alternativa ambientalmente segura y eficaz para mejorar la eficacia global de un agente de control biológico. Esta sigue siendo una necesidad de larga duración en la industria agrícola en comparación con los productos químicos peligrosos que se usan actualmente.

Sumario de la invención

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones. Cualquier aspecto, realización y ejemplo de la presente divulgación que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención y se proporciona únicamente con fines ilustrativos. La presente divulgación es útil para mejorar la competitividad de agentes biológicos o agentes de control biológico, particularmente sobre otros agentes microbianos. Por lo tanto, se mejora la protección contra plagas o agentes causantes de enfermedades (por ejemplo, plagas de insectos).

La presente divulgación se refiere a combinaciones, composiciones y métodos para mejorar la capacidad de una población de agentes biológicos o agentes de control biológico para competir y sobrevivir en un campo. Mejorando la población de agentes biológicos o agentes de control biológico, la población de agentes puede crecer, competir con otras cepas microbianas y hongos, y proporcionar una mayor protección contra patógenos o plagas, como, por ejemplo, fitopatógenos o insectos.

La presente divulgación también se refiere a una composición que comprende uno o más microorganismos y

germinantes, así como a métodos que comprenden la aplicación de la composición para estimular una germinación más rápida de las esporas de uno o más microorganismos sobre un sustrato u hospedador no óptimo para el crecimiento microbiano y, por lo tanto, proporcionar una mayor protección contra patógenos o plagas, como, por ejemplo, fitopatógenos o insectos.

5 Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para mejorar la tasa de germinación de una espora microbiana que comprende poner en contacto con un hospedador: (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen al género *Chlonostachys*, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Serendipita* o *Trichoderma*, y combinaciones de los mismos, y (b) uno o más germinantes, en donde dicho uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos. Al entrar en contacto la una o más esporas microbianas y el uno o más germinantes con el hospedador, la una o más esporas microbianas del agente biológico o el agente de control biológico pueden exhibir una germinación de esporas aumentada en comparación con el contacto de una o más esporas microbianas con el hospedador sin el uno o más germinantes. Las esporas microbianas de la invención son esporas fúngicas. El hospedador puede ser suelo, una plaga, una planta o una parte de una planta, opcionalmente, en donde la parte de una planta comprende o consiste en una semilla.

La presente invención también proporciona un método para:

20 controlar un fitopatógeno o una plaga o proteger una planta de un fitopatógeno o una plaga, en donde el fitopatógeno es un hongo o la plaga es una plaga de insectos, comprendiendo dicho método poner en contacto el suelo, una plaga, una planta o una parte de una planta con (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen al género *Chlonostachys*, *Beauveria* o *Cordyceps*, y combinaciones de los mismos, y (b) uno o más germinantes, en donde dicho uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos; o

30 mejorar el crecimiento, desarrollo y/o productividad de una planta, comprendiendo dicho método poner en contacto el suelo, una plaga, una planta o una parte de una planta con (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen al género *Serendipita* o *Trichoderma*, y combinaciones de los mismos, y (b) uno o más germinantes, en donde dicho uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos.

La presente invención proporciona además un método para mejorar la eficacia de un agente biológico o agente de control biológico, comprendiendo dicho método poner en contacto el suelo, una plaga, una planta o una parte de una planta con (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen al género *Chlonostachys*, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Serendipita* o *Trichoderma*, y combinaciones de los mismos, y (b) uno o más germinantes, en donde dicho uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, un derivado de levadura o una combinación de los mismos. Al entrar en contacto la una o más esporas fúngicas y el uno o más germinantes con el suelo, la plaga, la planta o la parte de una planta, la una o más esporas fúngicas del agente de control biológico pueden exhibir una mejor eficacia en la inhibición de fitopatógenos o exhibir un mayor control de plagas en comparación con el contacto de una o más esporas fúngicas con el hospedador sin el uno o más germinantes o la una o más esporas fúngicas del agente biológico exhiben una mejor eficacia en la mejora del crecimiento, desarrollo y/o productividad de las plantas. La mejora del crecimiento, el desarrollo y/o la productividad de una planta pueden comprender mejorar al menos uno de los siguientes: el grado de micorrización, el enraizamiento de la planta, el crecimiento de la planta, la altura de la planta, el florecimiento de la planta, la biomasa fresca de la planta, la biomasa seca de la planta, el rendimiento de la planta, la nutrición de la planta, la resistencia de la planta a los estreses abióticos y combinaciones de los mismos. La parte de una planta puede comprender o consistir en una semilla. El contacto puede comprender aplicar de manera foliar a la planta o parte de una planta la una o más esporas microbianas de un agente de control biológico y el uno o más germinantes.

55 Además, se proporciona por la presente invención un método para fabricar una composición que comprende mezclar (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen al género *Chlonostachys*, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Serendipita* o *Trichoderma*, y combinaciones de los mismos, y (b) uno o más germinantes para obtener una composición que comprenda (a) la una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico y (b) el uno o más germinantes, en donde dicho uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos. Dicho método puede comprender además mezclar la (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico y (b) uno o más germinantes con (c) un portador para obtener una composición que comprenda (a) la una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, (b) el uno o más germinantes y (c) el portador. Dicha composición puede ser para controlar un fitopatógeno o una plaga o mejorar

el crecimiento, desarrollo y/o productividad de una planta.

La presente invención proporciona adicionalmente una composición para controlar un fitopatógeno o una plaga o mejorar el crecimiento, desarrollo y/o productividad de una planta, en donde la composición comprende (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen al género *Chlonostachys*, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Serendipita* o *Trichoderma*, y combinaciones de los mismos; y (b) uno o más germinantes, en donde dicho uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos; comprendiendo además, opcionalmente, (c) un portador.

La presente invención proporciona además el uso de una cantidad eficaz de (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o un agente de control biológico, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen al género *Chlonostachys*, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Serendipita* o *Trichoderma*, y combinaciones de los mismos, y (b) uno o más germinantes para mejorar la tasa de germinación de la una o más esporas fúngicas de un agente biológico o un agente de control biológico, en donde dicho uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos. El uso puede mejorar la tasa de germinación de la una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico controlando de este modo un fitopatógeno o una plaga o mejorando el crecimiento y el desarrollo y/o productividad de una planta. El uso puede mejorar la tasa de germinación y la actividad antimicrobiana o la actividad plaguicida de la una o más esporas fúngicas del agente de control biológico en comparación con la tasa de germinación y la actividad antimicrobiana o la actividad plaguicida de la una o más esporas fúngicas de un agente de control biológico cuando se usan sin el uno o más germinantes. El uso puede mejorar la tasa de germinación y la eficacia en la mejora del crecimiento de las plantas, el desarrollo y/o la productividad de la una o más esporas fúngicas del agente biológico en comparación con la tasa de germinación y la eficacia en la mejora del crecimiento, el desarrollo y/o la productividad de las plantas de la una o más esporas del agente de control biológico cuando se usan sin el uno o más germinantes.

En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, composiciones o usos de la presente invención, el uno o más germinantes pueden comprender glicina betaína. En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, composiciones o usos de la presente invención, el uno o más germinantes pueden comprender un extracto de levadura o un derivado de levadura. Preferentemente, el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura. En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, composiciones o usos de la presente invención, el uno o más germinantes pueden comprender una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura. Preferentemente, el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura.

En cualquiera de los métodos, composiciones o usos de la presente invención, la una o más esporas microbianas de un agente biológico o un agente de control biológico son una o más esporas fúngicas.

La una o más esporas fúngicas pueden ser una o más esporas fúngicas de *Chlonostachys rosea* var. *catenulatum*, *Beauveria bassiana*, *Cordyceps javanica*, *Trichoderma asperellum*, o combinaciones de los mismos. La una o más esporas fúngicas pueden ser una o más esporas fúngicas entomopatógenas. La una o más esporas fúngicas entomopatógenas pueden ser una o más esporas fúngicas entomopatógenas de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps javanica*, o combinaciones de las mismas. La una o más esporas fúngicas pueden ser uno o más conidios o clamidosporas. La una o más esporas fúngicas pueden ser una o más esporas fúngicas de *Chlonostachys rosea* var. *catenulatum*. Preferentemente, *Chlonostachys rosea* var. *catenulatum* es *C. rosea* f. *catenulate*. Más preferentemente, *C. rosea* f. *catenulate* es *C. rosea* f. *catenulate* cepa J1446, que se depositó el 19 de mayo de 1994 según el Tratado de Budapest con el número de referencia DSM 9212 en el DSM Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania).

En realizaciones específicas de cualquiera de los métodos descritos anteriormente, composiciones o usos de la presente invención: (i) la una o más esporas microbianas de un agente de control biológico con una o más esporas de *C. rosea* f. *catenulata* y el uno o más germinantes comprenden glicina betaína, opcionalmente, *C. rosea* f. *catenulata* es de la cepa J1446; (ii) la una o más esporas microbianas de un agente de control biológico son una o más esporas de *C. rosea* f. *catenulata* y el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura o un derivado de levadura, preferentemente, el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura y, opcionalmente, *C. rosea* f. *catenulata* es de la cepa J1446; (iii) la una o más esporas microbianas de un agente de control biológico son una o más esporas de *C. rosea* f. *catenulata* y el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura o un derivado de levadura, preferentemente, el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura y, opcionalmente, *C. rosea* f. *catenulata* es de la cepa J1446; (iv) la una o más esporas microbianas de un agente de control biológico son una o más esporas de *Beauveria bassiana* y el uno o más germinantes comprenden glicina betaína; (v) la una o más esporas microbianas de un agente de control biológico son una o más esporas de *Beauveria bassiana* y el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura o un derivado de levadura, preferentemente, el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura; (vi) la una o más esporas microbianas de un agente de control biológico son una o más esporas de *Beauveria bassiana* y el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura o un derivado

de levadura, preferentemente, el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura; (vii) la una o más esporas microbianas de un agente de control biológico son una o más esporas de *Cordyceps javanica* y el uno o más germinantes comprenden glicina betaína; (viii) la una o más esporas microbianas de un agente de control biológico son una o más esporas de *Cordyceps javanica* y el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura o un derivado de levadura, preferentemente, el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura; (ix) la una o más esporas microbianas de un agente de control biológico son una o más esporas de *Cordyceps javanica* y el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura; (x) la una o más esporas microbianas de un agente biológico son una o más esporas de *Trichoderma asperellum* y el uno o más germinantes comprenden glicina betaína; (xi) la una o más esporas microbianas de un agente biológico son una o más esporas de *Trichoderma asperellum* y el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura o un derivado de levadura, preferentemente, el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura; o (xii) la una o más esporas microbianas de un agente biológico son una o más esporas de *Trichoderma asperellum* y el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura.

En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, composiciones o usos de la presente invención, el fitopatógeno puede ser un hongo. En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, composiciones o usos de la presente invención, el fitopatógeno pertenece al género *Botrytis*, *Erysiphe*, *Rhizoctonia*, *Venturia*, *Didymella*, *Fusarium*, *Pseudoidium*, *Podoshaera* y combinaciones de los mismos. El fitopatógeno puede pertenecer al género *Botrytis*, preferentemente, en donde el fitopatógeno es *Botrytis cinerea*. El fitopatógeno puede pertenecer al género *Erysiphe*, preferentemente, en donde el fitopatógeno es *Erysiphe necator*. El fitopatógeno puede pertenecer al género *Rhizoctonia*, preferentemente, en donde el fitopatógeno es *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia bataticola*; *Rhizoctonia fragariae*; *Rhizoctonia leguminicola* o *Rhizoctonia oryzae*, preferentemente, en donde el fitopatógeno es *Rhizoctonia solani*. El fitopatógeno puede pertenecer al género *Venturia*, preferentemente, en donde el fitopatógeno es *Venturia inaequalis*. El fitopatógeno puede pertenecer al género *Pseudoidium*, preferentemente, en donde el fitopatógeno es *Pseudoidium neolycopersici*. El fitopatógeno pertenece al género *Podoshaera*, preferentemente, en donde el fitopatógeno es *Podosphaera xanthii*.

En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, composiciones o usos de la presente invención, el fitopatógeno puede ser una plaga de insectos. La plaga de insectos puede pertenecer a la especie *Diuraphis noxia*, *Bemisia argentifolii*, *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Aleyrodes lonicerae*, *Diaphorina citri*, *Euphyllura olivine*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulacorthum solani*, *Heliothrips haemorrhoidalis*, *Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella schulzei*, *Thrips tabaci*, *Scirtothrips dorsalis*, *Hercinothrips femoralis*, *Dalbulus maidis*, *Phenacoccus solenopsis*, *Pseudococcus longispinus*, *Paracoccus marginatus*, *Mahanarva fimbriolata*, *Deois flavopicta*, *Zulia entrerriana*, *Notozulia entrerriana*, *Hypothenemus hampei*, *Hedypathes betulinus*, *Cosmopolites sordidus*, *Gonipterus scutellatus*, *Agriotes spp.*, *Plutella xylostella*, *Helicoverpa armigera*, *Otiorrhynchus sultacus*, *Fungus gnats*, *Exomala orientalis*, *Sciaridae*, *Otiorrhynchus sulcatus*, *Strophosoma melanogrammmum*, *S. capitatum*, *Phyllopertha horticola*, *Amphimallon solstitialis*, *Daktulosphaira vitifoliae*, *Diabrotica virgifera*, *Spodoptera spp*, *Oligonychus ilicis*, *Planococcus citri*, *Anthonomus grandis*, *Brevicoryne brassicae* o *Sphenophorus levis*.

En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, composiciones o usos de la presente invención, la plaga puede pertenecer a la especie *Bemisia tabaci*, *Bemisia argentifolii*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Hypothenemus hampei*, *Cosmopolites sordidus*, *Sphenophorus levis*, *Anthonomus grandis*, *Diaphorina citri*, *Helicoverpa armigera*, *Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella schulzei*, *Thrips tabaci*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *Oligonychus ilicis*, *Planococcus citri*, *Mahanarva fimbriolata*, *Agriotes spp*, *Diabrotica spp* o *Dalbulus maidis*. Preferentemente, la plaga es *Bemisia tabaci*, más preferentemente, la plaga es *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemípteros: *Aleyrodidae*).

En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, composiciones o usos de la presente invención, dicha (a) una o más esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico, y (b) uno o más germinantes pueden usarse simultáneamente, por separado o secuencialmente. Preferentemente, dicha (a) una o más esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico; y (b) uno o más germinantes se usan simultáneamente.

En realizaciones específicas de cualquiera de los métodos o usos de la presente invención descritos anteriormente: (i) el uno o más germinantes comprenden o consisten en glicina betaína, y la glicina betaína se aplica al suelo o al hospedador, la planta o parte de una planta a una concentración de al menos el 0,001 %, 0,002 %, 0,003 %, 0,004 %, 0,005 %, 0,006 %, 0,007 %, 0,008 %, 0,009 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 % o el 5 %; (ii) el uno o más germinantes comprenden o consisten en un extracto de levadura o un derivado de levadura, y el extracto de levadura o el derivado de levadura se aplica al suelo o al hospedador, la planta o parte de una planta a una concentración de al menos el 0,001 %, 0,002 %, 0,003 %, 0,004 %, 0,005 %, 0,006 %, 0,007 %, 0,008 %, 0,009 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 % o el 5 %; y/o (iii) la una o más esporas microbianas de un agente biológico o un agente de control biológico se aplican al suelo o al hospedador, una planta o una parte de una planta o la una o más esporas microbianas de un agente biológico o un agente de control biológico

a una concentración de al menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} o aproximadamente 1×10^{12} UFC/g.

En realizaciones específicas de cualquiera de las composiciones descritas anteriormente de la presente invención: (i) el uno o más germinantes comprenden o consisten en glicina betaína, y la glicina betaína está presente en la composición a una concentración de al menos el 0,001 %, 0,002 %, 0,003 %, 0,004 %, 0,005 %, 0,006 %, 0,007 %, 0,008 %, 0,009 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 % o el 5 %; (ii) el uno o más germinantes comprenden o consisten en un extracto de levadura o un derivado de levadura, y el extracto de levadura o el derivado de levadura está presente en la composición a una concentración de al menos aproximadamente el 0,001 %, 0,002 %, 0,003 %, 0,004 %, 0,005 %, 0,006 %, 0,007 %, 0,008 %, 0,009 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 % o el 5 %; y/o (iii) la una o más esporas microbianas de un agente biológico o un agente de control biológico están presentes en la composición a una concentración de al menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} o aproximadamente 1×10^{12} UFC/g.

En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, composiciones o usos de la presente invención, la planta o parte de una planta pueden ser cereales, maíz, arroz, pastos, caña de azúcar, plantas leguminosas, cultivo forrajero, plantas ricas en aceite y proteínas, cultivos de hortalizas, árboles frutales, cultivos de viticultura, cultivos urbanos o cultivos ornamentales.

En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, composiciones o usos de la presente invención, el uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos. El uno o más germinantes pueden comprender o consistir en un extracto de levadura, y el extracto de levadura puede ser un extracto de levadura soluble.

En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, composiciones o usos de la presente invención, el uno o más germinantes pueden comprender o consistir en un derivado de levadura seleccionado de levadura inactiva, paredes celulares de levadura y combinaciones de las mismas. Las paredes celulares de levadura pueden ser una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos.

Figuras

Habiendo descrito así generalmente la naturaleza de la invención, a continuación se hará referencia a los dibujos adjuntos, mostrando a modo de ilustración, una realización preferida de los mismos, y en los que:

La figura 1 muestra el porcentaje de la tasa de germinación de Prestop® al 0,025 % (esporas de *C. rosea* f. *catenulata* J1446) junto con glicina betaína (0,06 % y 0,6 %) o extracto de levadura (0,04 % y 0,2 %) en discos foliares durante un período de 24 horas en comparación con la aplicación única de Prestop® al 0,025 %.

La figura 2 muestra las mediciones de los diámetros finales de crecimiento de discos foliares de *C. rosea* f. *catenulata* J1446 cortados después de (a) 1 día, (b) 2 días (c) 3 días o (d) 6 días después de la inoculación en el invernadero y 6 días más de incubación en placas. Se aplicó Prestop® a una concentración del 0,025 %, glicina betaína a una concentración del 0,06 % y 0,6 % o extracto de levadura a una concentración del 0,04 % y del 0,2 %.

La figura 3 muestra la eficacia de la combinación de Prestop® (*C. rosea* f. *catenulata* J1446) a una concentración del 0,003 % y glicina betaína a una concentración del 0,05 % y del 0,2 % en el control de *Botrytis cinerea* en comparación con tratamientos con solo Prestop® y solo glicina betaína.

La figura 4 muestra la eficacia de una tasa de dosis menor de Prestop® (*C. rosea* f. *catenulata* J1446) a una concentración del 0,001 % junto con glicina betaína (a una concentración del 0,06 % o del 0,08 %) en el control de *Botrytis cinerea* en comparación con la aplicación única de Prestop® y glicina betaína.

La figura 5 muestra la eficacia de Prestop® (*C. rosea* f. *catenulata* J1446) a una concentración de 0,7 g/l junto con glicina betaína a una concentración de 0,5 g/l sobre el desarrollo de mildiú pulverulento en esquejes de vid en comparación con la aplicación de agua o la aplicación única de Prestop® y glicina betaína.

Descripción detallada

La presente divulgación permite el aumento de la germinación de esporas de agentes biológicos o agentes de control biológico y, por lo tanto, mejorar la capacidad de los agentes biológicos o de los agentes de control biológico para competir y sobrevivir en un entorno de campo. Estimulando y mejorando la población de agentes biológicos o agentes de control biológico, la población puede crecer, competir con otros organismos microbianos y proporcionar una mejor protección contra los patógenos como, por ejemplo, fitopatógenos o plagas.

Dado que la germinación de las esporas constituye la primera etapa en el proceso de colonización fúngica, una activación más rápida y mayor de la germinación conducirá a una mayor colonización (y también a una mayor esporulación y producción de conidios) y establecimiento de hongos beneficiosos.

5 Como se conoce en la técnica, pueden usarse hongos como agentes biológicos o agentes de control biológico. De hecho, las esporas son el principal mecanismo de inoculación de estos hongos y, por lo tanto, el aumento de la germinación de las esporas de los agentes fúngicos de control biológico permite, entre otras cosas, un mayor o más rápido crecimiento y colonización del tejido vegetal. De hecho, un suelo, plaga, partes de una planta o una planta no
10 siempre son un sustrato u hospedador óptimo para el crecimiento microbiano. Además, los resultados de los presentes estudios han permitido vincular la aumentada (o mayor) tasa de germinación de esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico con una mejor, mayor o mejor actividad biológica o actividad de control biológico.

15 La presente divulgación se refiere a un método para controlar un fitopatógeno o una plaga o proteger una planta o parte de una planta contra un fitopatógeno o una plaga que comprende poner en contacto una planta o parte de una planta con (a) una o más esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico; y (b) uno o más germinantes como se expone en las reivindicaciones. De manera interesante, el uso del uno o más germinantes de la presente divulgación hace posible reducir la concentración del agente biológico o agente de control biológico (es decir,
20 reducir la concentración de la una o más esporas microbianas) mientras se demuestra un efecto comparable o superior al observado cuando se usan dosis normales de agente biológico o agente de control biológico.

La presente divulgación también se refiere a un método para mejorar la germinación de una espora microbiana de un agente biológico o agente de control biológico que comprende poner en contacto una o más esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico y uno o más germinantes con un hospedador como se expone en las reivindicaciones, en donde, al entrar en contacto la una o más esporas microbianas y el uno o más germinantes con un hospedador, la una o más esporas microbianas del agente biológico o el agente de control biológico exhiben una mayor germinación de esporas en el hospedador en presencia del uno o más germinantes en comparación con el contacto de una o más esporas microbianas del agente biológico o agente de control biológico en una planta o parte
25 de una planta sin el uno o más germinantes. Como se usa en el presente documento, el término "hospedador" significa un material vegetal, suelo, plagas, insectos o nematodos. En una realización, el hospedador es un insecto, un acaro, una planta o una parte de una planta.

En otro aspecto más, en el presente documento se describe un método para inducir la germinación de una espora microbiana. En una realización, el método comprende inducir la germinación de un microorganismo que comprende aplicar de manera foliar o poner en contacto una o más esporas microbianas y uno o más germinantes con una planta o parte de una planta, en donde, tras la aplicación foliar de la una o más esporas microbianas y el uno o más germinantes a una planta o parte de una planta, la una o más esporas microbianas exhiben una mayor germinación en la planta o parte de una planta en presencia del uno o más germinantes en comparación con la aplicación foliar de una o más esporas microbianas solas (es decir, sin uno o más germinantes) en una planta o parte de una planta.
35

En otra realización, la presente divulgación proporciona una combinación de componentes o una composición que comprende (a) una o más esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico; y (b) uno o más germinantes, en donde dicha composición controla un fitopatógeno o una plaga. El (a) una o más esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico; y (b) uno o más germinantes están presentes en una forma que se puede suministrar de forma simultánea, secuencial o por separado entre sí a una planta o parte de una planta o una plaga. Como se usa en el presente documento, mediante el término "combinación", este término significa dos o más sustancias próximas entre sí y/o usadas juntas, independientemente de si se incluye un portador. La composición que comprende (a) una o más esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico; y (b) uno o más germinantes pueden considerarse una combinación. Como se usa en el presente documento, la expresión "suministrar simultáneamente" significa que (a) una o más esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico; y (b) uno o más germinantes se suministran a una planta o parte de una planta o una plaga al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo mediante el mismo modo de aplicación. Como se usa en el presente documento, la expresión "suministrar por separado" significa que (a) una o más esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico; y (b) uno o más germinantes se suministran a una planta o parte de una planta o una plaga al mismo tiempo o sustancialmente al mismo tiempo mediante un modo diferente de aplicación. Como se usa en el presente documento, la expresión "suministrar secuencialmente" significa que (a) una o más esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico; y (b) uno o más germinantes se suministran a una planta o parte de una planta o una plaga en diferentes momentos (es decir, (a) puede ser antes o después de (b)),
45
50
55
60 siendo el modo de aplicación idéntico o diferente.

Como alternativa, la combinación de esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico y germinantes de la presente divulgación se puede usar para reducir significativamente enfermedades o plagas. Más particularmente, la presente divulgación proporciona un uso de una cantidad eficaz de (a) una o más esporas microbianas; y (b) uno o más germinantes para mejorar la germinación de una espora microbiana y controlar de este modo un fitopatógeno o una plaga como se expone en las reivindicaciones.
65

Como se usa en el presente documento, las expresiones "agentes biológicos", "agente/s de control biológico" se usan todas indistintamente y significan cualquier organismo biológico que tenga una actividad biológica en una semilla, una planta o una parte de una planta o contra una plaga y/o capaz de tener una o más propiedades beneficiosas para una planta o una parte de planta (por ejemplo, capaz de promover el crecimiento de la planta, capaz de tener actividad fungicida, capaz de tener actividad plaguicida, etc.). Los "agentes biológicos" o "agentes de control biológico" de la presente divulgación incluyen microorganismos (por ejemplo, hongos) que controlan plagas o fitopatógenos que causan enfermedades (es decir, insectos) y/o promueven la salud, el crecimiento y el rendimiento de la planta. Los ejemplos no limitantes de "actividad biológica" incluyen la fijación de N₂, solubilización de fosfato, mejora del crecimiento de las plantas, actividad plaguicida, actividad bioplaguicida (por ejemplo, bioinsecticida o bionematicida), actividad biofungicida, etc.

Como se usan en el presente documento, los términos "control" o "controlar" se refieren a la reducción del número de fitopatógenos o plagas, particularmente plagas de insectos, lograda usando la composición de la presente divulgación. En cuanto al control de fitopatógenos, la composición o método de la presente divulgación es útil para impartir a las plantas protección contra fitopatógenos, para modular, reducir, prevenir o mejorar una infección causada por un fitopatógeno. Con respecto a la reducción de plagas (por ejemplo, insectos), generalmente se entiende que es la reducción del número o la erradicación de plagas o la inhibición de su tasa de reproducción.

Como se usa en el presente documento, la expresión "actividad (o eficiencia) del control biológico mejorada, aumentada o potenciada o actividad (o eficiencia) fungicida significa que hay una eficacia mejorada o potenciada en la inhibición de hongos fitopatógenos (o esporas fúngicas) o plagas. Tal inhibición mejorada incluye, pero sin limitación, una disminución del crecimiento de dichos hongos patógenos, micelio y/o producción de sus esporas o una reducción de plagas como se ha mencionado anteriormente. Como se usa en el presente documento, "actividad o eficacia del control biológico mejorada, aumentada o potenciada" significa que hay una eficacia general mejorada, aumentada, potenciada o superior en el biocontrol o control biológico, tal como en el contexto de una aplicación de control biológico en plantas o contra plagas en comparación con la eficacia de control biológico del agente de control biológico sin la presencia del uno o más germinantes.

En el contexto de la presente divulgación, la expresión "actividad biológica mejorada, aumentada o potenciada (o mejorar una actividad de biofertilización)" significa un mayor rendimiento de las plantas o un mayor crecimiento de las plantas, la altura de las plantas (por ejemplo, aumento de la biomasa (la biomasa fresca y/o la biomasa seca), la floración, aumento del número de frutos, aumento de cápsulas, aumento del número o tamaño de semillas, o una combinación de los mismos, según lo medido por cualquier método conocido en la técnica), aumento del número de raíces, aumento de la masa de la raíz, aumento del volumen de la raíz, aumento del área foliar, mayor soporte de la planta, aumento del vigor de la planta, emergencia más rápida de las plántulas (es decir, emergencia mejorada), germinación más rápida, (es decir, germinación mejorada), aumento del grado de micorrización, la nutrición, la resistencia al estrés abiótico o combinaciones de los mismos. Los hongos micorrízicos y, por ejemplo, el hongo *Trichoderma* (por ejemplo, *T. asperellum* (un ejemplo es el producto Quality®, Lallemand) tienen esta capacidad de promover o estimular el crecimiento de la planta, el desarrollo de la planta o la salud de la planta.

El agente de control biológico es un agente de control biológico fúngico. El uno o más agentes de control biológico fúngicos de la invención son los indicados en las reivindicaciones. Los microorganismos fúngicos particulares de interés incluyen cepas de *Chlonostachys*, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Serendipita* o *Trichoderma*

En el contexto de la presente divulgación, el agente de control biológico puede ser el hongo *C. rosea*. Puede usarse cualquier especie o cepa de *C. rosea*. De hecho, muchos aislados de *C. rosea* son antagonistas muy eficaces contra varios hongos fitopatógenos. El agente de control biológico *C. rosea* es un fitopatógeno fúngico antagonista que está ampliamente presente en el suelo y puede producir una serie de metabolitos antibacterianos. En una realización, *C. rosea* es *C. rosea f. catenulata*. En una realización adicional, el hongo es *C. rosea f. catenulata* J1446. Esta cepa ha sido depositada el 19 de mayo de 1994 según el Tratado de Budapest al depositario del DSM (DSM Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania) con el número de referencia DSM 9212. *C. rosea f. catenulata* J1446 está disponible comercialmente como la marca comercial PRESTOP® o LALSTOP G46 (Lallemand (Verdera, Finlandia)). En una realización, la una o más esporas microbianas son esporas fúngicas entomopatógenas. En otra realización particular, la una o más esporas fúngicas entomopatógenas (por ejemplo, conidios) son una o más esporas fúngicas entomopatógenas de *Beauveria* (por ejemplo, *B. bassiana* (un ejemplo es el producto Granada® de Lallemand) o también pueden usarse *Cordyceps* (por ejemplo, *C. javanica*) en el contexto de la presente divulgación.

Como se usan en el presente documento, los términos "espora" o "espora microbiana" tienen su significado normal que se conoce bien y se entiende por los expertos en la técnica. Como se usan en el presente documento, los términos "espora" y "espora microbiana" significan un microorganismo en su estado latente protegido. En el contexto de la presente divulgación, la expresión "una o más esporas microbianas" se refiere a "una o más esporas microbianas" de un agente de control biológico. En una realización preferida, la expresión "una o más esporas microbianas" se refiere a una o más esporas fúngicas. En una realización particular, las esporas fúngicas incluyen esporas formadas sexualmente (por ejemplo, oosporas, cigosporas o ascosporas) y asexualmente (por ejemplo, conidios, clamidosporas,

blastosporas, uredosporas, teleutosporas y ustosporas). Las "esporas fúngicas" también incluyen micelio o fragmentos de micelio. En una realización particular, las esporas fúngicas son conidios. En una realización particular, las esporas fúngicas son clamidosporas.

5 Como se usa en el presente documento, el término "germinante(s)" o "inductor(es)" significa cualquier sustancia o compuesto que induzca, aumente o mejore la tasa de germinación de esporas microbianas de agentes biológicos o agentes de control biológico, por ejemplo, una sustancia o compuesto que induce la germinación de una espora microbiana de agentes biológicos o un agente de control biológico, tal como una espora fúngica, y permite una mayor colonización y eficacia de los agentes biológicos o agentes de control biológico. En una realización, el "germinante(s)"
10 o "inductor(es)" de la presente divulgación también puede aumentar la esporulación. Se puede considerar que el "germinante(s)" o "inductor(es)" de la presente divulgación tiene una actividad prebiótica. Los prebióticos se definen como sustancias que estimulan selectivamente los microorganismos proporcionando un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador y una ventaja competitiva. Esta definición se puede ampliar tanto para su uso en salud humana, para la industria alimentaria y para su aplicación en la agricultura, ya que se trata de un grupo de compuestos a base
15 de vitaminas, minerales, aminoácidos y proteínas que pueden actuar estimulando el crecimiento y la actividad de los microorganismos.

En el contexto de la presente divulgación, los ejemplos de germinantes de agentes de control biológico fúngicos son glicina betaína, extractos de levadura o una combinación de los mismos.
20

En una realización, el germinante usado en el contexto de la presente divulgación es glicina-betaína. La glicina-betaína extraída de la remolacha azucarera está disponible comercialmente, por ejemplo, como la marca comercial IntraCell®, Greenstim®, Bluestim®, Osmopro® o LALSTIM Osmo® (Lallemand). Otros productos de betaína, tales como betaína monohidrato, clorhidrato de betaína y líquidos de betaína cruda, también están disponibles comercialmente y pueden usarse para los fines de la presente divulgación.
25

Todos los tipos de extractos de levadura o derivados de levadura disponibles comercialmente pueden usarse en el contexto de la presente invención. La expresión "fracción de levadura" abarca sustancias obtenidas por separación de las paredes celulares (por ejemplo, las cáscaras) del resto de la célula de levadura. La expresión "pared celular de levadura" corresponde a las cáscaras de las células de levadura con la exclusión del contenido de las células de levadura. El "extracto de levadura" corresponde al contenido de las células de levadura con exclusión de las paredes celulares (por ejemplo, las cáscaras). Más particularmente, la expresión "extracto de levadura" se refiere al contenido de las células de levadura, obteniéndose dicho contenido mediante cualquier método de extracción adecuado conocido por los expertos en la técnica. Por lo tanto, más particularmente, la expresión "extracto de levadura" abarca los
30 componentes solubles en agua de la célula de levadura. Generalmente, los extractos de levadura se producen (a) sometiendo una levadura a autolisado; (b) sometiendo el autolisado a separación sólido/líquido; y (c) recuperando la fracción líquida, es decir, un extracto de levadura soluble. Preferentemente, el extracto de levadura usado en el contexto de la presente invención es un extracto de levadura soluble. La expresión "levadura inactiva" abarca las levaduras que han sido destruidas por cualquier proceso químico o fisicoquímico. Más comúnmente, las levaduras se destruyen por choque térmico al final del proceso de producción y a continuación se secan. La expresión "derivados de levadura" abarca la levadura inactiva, la fracción de pared celular de levadura o productos de pared celular de levadura. El extracto de levadura o el derivado de levadura (por ejemplo, las paredes celulares de levadura o la levadura inactiva) usados en la presente invención pueden proceder de cualquier especie de levadura, preferentemente, una especie de levadura del género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida* o *Torula*. En realizaciones preferidas de cualquiera de los métodos, composiciones o usos de la presente invención, el extracto de levadura es un extracto de levadura soluble y procede de *S. cerevisiae*.
35
40
45

Como se usan en el presente documento, las expresiones "germinación aumentada", "mayor tasa de germinación", "germinación mejorada" y variaciones de las mismas, pretenden significar: un aumento en la proporción de esporas aplicadas que germinan en presencia de un germinante en comparación con la proporción de esporas aplicadas que germinan en ausencia de un germinante; y/o un aumento en la velocidad a la que las esporas aplicadas germinan en presencia de un germinante en comparación con la velocidad a la que las esporas aplicadas germinan en ausencia de un germinante.
50

Como se usan en el presente documento, los términos y expresiones "planta(s)" y "parte(s) de una planta" significan todas las plantas y poblaciones de plantas, tales como plantas silvestres deseadas y no deseadas o plantas de cultivo (incluidas plantas de cultivo de origen natural). Debe entenderse que las partes de una planta significan todas las partes y órganos de plantas por encima y por debajo del suelo, tales como brote, hoja, flor y raíz, siendo ejemplos que se pueden mencionar hojas, agujas, tallos subterráneos, tallos, flores, cuerpos fructíferos, frutos, semillas, raíces, tubérculos y rizomas. Las partes de la planta también incluyen material cosechado y también material de propagación vegetativa y generativa (por ejemplo, esquejes, tubérculos, rizomas, retoños y semillas, etc.). La combinación de la presente divulgación puede aplicarse a cualquier tipo de planta (es decir, tanto a plantas leguminosas como no leguminosas). Los ejemplos de plantas incluyen, pero sin limitación, cereales (tales como trigo, cebada, avena, centeno, tritical), maíz, arroz, pastos, caña de azúcar, algodón, plantas leguminosas (tales como alfalfa, trébol, esparceta, etc.), cultivo forrajero (tal como raigrás, festuca, pie de gallo, festulolium, veza, nabos forrajeros, rábanos forrajeros, etc.), plantas ricas en aceite y proteínas (tales como soja, colza, guisantes, habas, altramuz blanco, girasol,
55
60
65

etc.), cultivos de hortalizas (tales como tomates, lechuga, pepinos, pimientos morrones, berenjenas, calabacines, etc.), árboles frutales o arbustos frutales (tales como, fresas, arándanos, frambuesas, etc.), viticultura (vino y uvas de mesa) o árboles y cultivos urbanos y ornamentales (tales como la producción de flores, césped, viveros, etc.).

5 Como se usan en el presente documento, las expresiones "control de un fitopatógeno", "control de una plaga", "control de una plaga de insectos", "protección de una planta de un patógeno (tal como un fitopatógeno, una plaga o una plaga de insectos)" se refieren a uno o más de inhibir o reducir el crecimiento, germinación, reproducción y/o proliferación de un patógeno (por ejemplo, un fitopatógeno o una plaga de insectos) de interés; y/o matar, eliminar, destruir o disminuir de otro modo la aparición y/o la actividad de un patógeno de interés. Como se describe con más detalle en el presente documento, en realizaciones específicas, el agente de control biológico controla uno o más hongos patógenos tales como, por ejemplo, *Botrytis* spp. (por ejemplo, *B. cinerea*), *Didymella* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. (por ejemplo, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia bataticola*; *Rhizoctonia fragariae*, *Rhizoctonia leguminicola* o *Rhizoctonia oryzae*), *Verticillium* spp., *Cladosporium* spp., *Verticillium* spp., *Podosphaera* spp., *Cladosporium* spp., *Sclerotinia* spp. (por ejemplo, *S. sclerotiorum*), *Alternaria* spp., *Monilia* spp., *Monilinia* spp., *Colletotrichum* spp., *Cladosporium* spp., *Oidium* spp. *Didymella* spp., *Microdochium* spp., *Mycosphaerella* spp., *Puccinia* spp., *Septoria* spp., *Phaeosphaeria* spp., *Tapesia* spp., *Gaeumannomyces* spp., *Cochliobolus* spp. *Stagonospora* spp. o *Pseudoidium* spp. Los siguientes patógenos también pueden incluirse en la presente divulgación: *Oidium anacardii*, *Oidium lycopersici*, *Erysiphe betae*, *Oidium ericinum*, *Leveillula taurica*, *Golovinomyces cichoracearum*, *Podosphaera fusca*, *Leveillula taurica*, *Podosphaera myrtillina*, *Podosphaera spiraeae*, *Oidium neolycopersici*, *Sphaerotheca verbenae*, *Erysiphe necator* (*Uncinula necator*), *Erysiphe viburni*, *Erysiphe hedwigii*, *Podosphaera tridactyla*, *Microsphaera penicillata*, *Podosphaera clandestina*, *Podosphaera euphorbiae*, *Oidium heveae*, *Microsphaera polonica*, *Oidium dianthii*, *Neoerysiphe galeopsidis*, *Oidium tingitaninum*, *Microsphaera berberidis*, *Golovinomyces cynoglossi*, *Blumeria graminis*, *Erysiphe lonicerae*, *Erysiphe cruciferarum*, *Golovinomyces orontii*, *Leveillula cucurbitacearum*, *Podosphaera fusca* (syn. *Sphaerotheca fuliginea*), *Microsphaera begoniae*, *Plasmopora viticole*, *Phytophthora infentans* *Venturia inaequalis*, *Pseudoidium neolycopersici* o *Podosphaera xanthii*.

En otra realización, la composición, combinación o método de la presente divulgación pueden controlar plagas tales como plagas de insectos. Los ejemplos de plagas de insectos son ácaros, hemípteros, plagas de homóteros, plagas de tisanópteros, plagas de isópteros, plagas de lepidópteros, plagas de coleópteros, plagas de ortópteros, plagas de himenópteros o plagas de dípteros, etc.

Las esporas de hongos entomopatógenos de la presente divulgación pueden controlar, por ejemplo, una plaga de insectos perteneciente a la especie *Diuraphis noxia*, *Bemisia argentifolii*, *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Aleyrodes lonicerae*, *Diaphorina citri*, *Euphyllura olivine*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulacorthum solani*, *Heliothrips haemorrhoidalis*, *Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella schulzei*, *Thrips tabaci*, *Scirtothrips dorsalis*, *Hercinothrips femoralis*, *Dalbulus maidis*, *Phenacoccus solenopsis*, *Pseudococcus longispinus*, *Paracoccus marginatus*, *Mahanarva fimbriolata*, *Deois flavopicta*, *Zulia entreriana*, *Notozulia entreriana*, *Hypothenemus hampei*, *Hedypathes betulinus*, *Cosmopolites sordidus*, *Gonipterus scutellatus*, *Agriotes* spp., *Plutella xylostella*, *Helicoverpa armigera*, *Otiorrhynchus sultacus*, *Fungus gnats*, *Exomala orientalis*, *Sciaridae*, *Otiorrhynchus sulcatus*, *Strophosoma melanogrammmum*, *S. capitatum*, *Phyllopertha horticola*, *Amphimallon solstitialis*, *Daktulosphaira vitifoliae*, *Diabrotica virgifera*, *Spodoptera* spp, *Oligonychus ilicis*, *Planococcus citri*, *Anthonomus grandis*, *Brevicoryne brassicae* o *Sphenophorus levis*. En una realización, las plagas pertenecen a las especies *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemípteros: *Aleyrodidae*), *Bemisia argentifolii*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Hypothenemus hampei*, *Cosmopolites sordidus*, *Sphenophorus levis*, *Tetranychus urticae*, *Anthonomus grandis*, *Diaphorina citri*, *Helicoverpa armigera*, *Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella schulzei*, *Thrips tabaci*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *Oligonychus ilicis*, *Planococcus citri*, *Mahanarva fimbriolata*, *Agriotes* spp, *Diabrotica* spp o *Dalbulus maidis*.

La combinación o composición de acuerdo con la presente divulgación se puede aplicar poniendo en contacto la planta, parte de una planta, suelo o una plaga por cualquier medio conocido por el experto en la técnica. Como se usa en el presente documento, la expresión "poner en contacto" significa hacer que una planta, parte de una planta, suelo o una plaga se acerque a una forma líquida o sólida exógena (tal como un polvo) de una combinación o composición de acuerdo con la divulgación. Los ejemplos de dichos métodos incluyen, pero sin limitación, métodos de aplicación por sumergimiento, inmersión, rociado, bruma, nebulización, recubrimiento, empolvado o remojo. Las formas y métodos de aplicación dependen completamente de los fines previstos para asegurar la distribución más fina y uniforme de la una o más esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico y uno o más germinantes en la planta o parte de una planta, suelo o plagas. En una realización, la etapa de aplicación o contacto se repite más de una vez (es decir, que la etapa de contacto puede repetirse dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, etc.).

En una realización más particular, el método para inducir la germinación de una espora microbiana comprende la aplicación foliar de una o más esporas y uno o más germinantes al follaje de la planta. En aún otra realización, el método para inducir la germinación de una espora microbiana comprende la aplicación foliar de una o más composiciones descritas en el presente documento. El método puede comprender además someter a la planta o parte de una planta a uno o más ingredientes agrícolamente beneficiosos, aplicados de forma simultánea o secuencial con la una o más esporas microbianas o uno o más germinantes. En una realización, el uno o más ingredientes

agrícolamente beneficiosos se aplican de forma simultánea o secuencial con la una o más esporas microbianas. En otra realización, el uno o más ingredientes agrícolamente beneficiosos se aplican de forma simultánea o secuencial con el uno o más germinantes.

5 En otra realización, también se describe en el presente documento un método para tratar el suelo. En una realización, el método comprende poner en contacto un suelo con una o más esporas microbianas y uno o más germinantes. En otra realización, el método comprende poner en contacto un suelo con una o más esporas microbianas y uno o más germinantes, y hacer crecer una planta o parte de una planta en el suelo tratado. En otra realización adicional más, el método comprende poner en contacto un suelo con una o más de las composiciones descritas en el presente documento y hacer crecer una planta o parte de una planta en el suelo tratado. En una realización, la etapa de contacto se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica. Los ejemplos no limitantes de contacto con el suelo incluyen pulverizar el suelo, empapar el suelo, gotear sobre el suelo, rociar, aplicar aerosoles en el surco, gránulos, microgránulos y/o espolvorear el suelo. En una realización, la etapa de contacto se repite (por ejemplo, más de una vez, ya que en la etapa de contacto se repite dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, etc.). En una realización, la etapa de contacto comprende poner en contacto el suelo con una o más esporas microbianas secuencialmente con uno o más germinantes. En otra realización, la etapa de contacto comprende poner en contacto el suelo con una o más esporas microbianas o conidios simultáneamente con uno o más germinantes. En una realización particular, la etapa de contacto comprende introducir una o más de las composiciones descritas en el presente documento en el suelo.

20 La etapa de contacto puede tener lugar en cualquier momento durante el crecimiento de la planta o parte de una planta. En una realización, la etapa de contacto tiene lugar antes de que la planta o parte de una planta comience a crecer. En otra realización, la etapa de contacto tiene lugar después de que la planta o parte de una planta ha comenzado a crecer. En otra realización, la etapa de contacto con plagas (por ejemplo, insectos) puede tener lugar en cualquier fase de su desarrollo. Por ejemplo, las fases de desarrollo tales como, por ejemplo, huevos, ninfas, larvas, pupas y adultos pueden ser objetivos a niveles de infestación bajos, medios y altos.

25 En otra realización, el método comprende además la etapa de plantar una planta o parte de una planta. La etapa de plantación puede tener lugar antes, después o durante la etapa de contacto. En una realización, la etapa de plantación tiene lugar antes de la etapa de contacto. En otra realización, la etapa de plantación tiene lugar durante la etapa de contacto (por ejemplo, la etapa de plantación tiene lugar simultáneamente con la etapa de contacto, la etapa de plantación tiene lugar de forma sustancialmente simultánea con la etapa de contacto, etc.). En aún otra realización, la etapa de plantación tiene lugar después de la etapa de contacto.

30 En otro aspecto, las semillas pueden tratarse con una o más esporas microbianas y uno o más germinantes de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. En una realización particular, las semillas se pueden tratar con una o más de las composiciones descritas en el presente documento. En otra realización más, las composiciones descritas en el presente documento se formulan (por ejemplo, se mezclan, se añaden, etc.) con cualquier mezcla de tratamiento de semillas. Puede producirse el recubrimiento de la semilla, por ejemplo, por pulverización o goteo.

35 La combinación de la presente divulgación se aplica en una cantidad eficaz. Una cantidad eficaz de una o más esporas microbianas de un agente de control biológico y uno o más germinantes es una cantidad suficiente para controlar o inhibir los patógenos. En otras realizaciones, la cantidad eficaz de una o más esporas microbianas y uno o más germinantes es una cantidad suficiente para inducir la germinación de esporas de uno o más microorganismos (es decir, de una o más esporas microbianas del agente de control biológico). La dosis eficaz real en valor absoluto depende de factores que incluyen, pero sin limitación, interacciones sinérgicas o antagonistas entre los otros principios activos o inertes que pueden potenciar o reducir los efectos de germinación del uno o más germinantes, y la estabilidad del uno o más germinantes en composiciones y/o como tratamientos de plantas o partes de plantas. La tasa de aplicación de la una o más esporas microbianas de un agente de control biológico y uno o más germinantes puede variar de acuerdo con el patógeno al que se dirige, el cultivo a proteger, la gravedad de la enfermedad, la condición climática y similares. En algunos casos, la combinación de las esporas microbianas de un agente de control biológico y los germinantes puede mostrar una actividad sinérgica, donde la combinación de los dos excede lo esperado por su simple efecto aditivo.

40 Por ejemplo, la una o más esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico (por ejemplo, *C. rosea*, *B. bassiana*, *C. javanica* o *T. asperellum*) de la presente divulgación se formulan como una suspensión líquida o en un polvo seco de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. El cultivo biológicamente puro, suspensión o formulación (que comprende, pero sin limitación, conidios, fragmentos de micelio y esporas) se aplica al suelo, plaga, la planta o parte de una planta a una concentración de entre aproximadamente 10^3 a 10^{12} ufc ("unidad formadora de colonias")/ml, de aproximadamente 10^4 a 10^{11} ufc/ml, de aproximadamente 10^5 a 10^{10} ufc/ml o de aproximadamente 10^6 a 10^9 ufc/ml. La una o más esporas microbianas de un agente de control biológico (por ejemplo, *C. rosea*, *B. bassiana*, *C. javanica* o *T. asperellum*) se aplican al suelo, plaga, planta o parte de una planta en una suspensión líquida, o están presentes en una composición o combinación a una concentración de aproximadamente 1×10^4 , aproximadamente 1×10^5 , aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} ufc/ml o superior a 1×10^{13} ufc/ml. La una o más esporas microbianas de un agente

biológico o agente de control biológico (por ejemplo, *C. rosea*, *B. bassiana*, *C. javanica* o *T. asperellum*) también se pueden aplicar al suelo, plaga, planta o parte de una planta en una formulación seca (que comprende, pero sin limitación, conidios, fragmentos de micelio y esporas) a una concentración de entre aproximadamente 10^3 a 10^{12} ufc/g, de aproximadamente 10^4 a 10^{11} ufc/g, de aproximadamente 10^5 a 10^{10} ufc/g o entre 10^6 a 10^9 ufc/g. La una o más esporas microbianas de un agente biológico o agente de control biológico (por ejemplo, *C. rosea*, *B. bassiana*, *C. javanica* o *T. asperellum*) también se pueden aplicar al suelo, plaga, planta o parte de una planta en una formulación seca a una concentración de aproximadamente 1×10^4 , aproximadamente 1×10^5 , aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} , aproximadamente 1×10^{12} , aproximadamente 1×10^{13} ufc/ml o superior a 1×10^{13} ufc/g. La cantidad óptima puede variar según la especie de cultivo, los fitopatógenos o plagas y se puede determinar fácilmente por los expertos en la técnica.

En una realización, la glicina betaína se aplica a una planta o parte de una planta o la cantidad de glicina betaína en la composición o la combinación está a una concentración de al menos el 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,015 %, 0,02 %, 0,025 %, 0,03 %, 0,035 %, 0,04 %, 0,045 %, 0,05 %, 0,055 %, 0,06 %, 0,065 %, 0,07 %, 0,075 %, 0,08 %, 0,085 %, 0,09 %, 0,095 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 % o más del 5 %, 5,5 %, 6 %, 6,5 %, 7 %, 7,5 %, 8 %, 8,5 %, 9 %, 9,5 % o más del 10 %. En una realización preferida, la glicina betaína se aplica a una concentración de al menos el 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %.

En una realización, el extracto de levadura se aplica a una planta o parte de una planta o la cantidad de extracto de levadura en la composición o la combinación está a una concentración de al menos el 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,015 %, 0,02 %, 0,025 %, 0,03 %, 0,035 %, 0,04 %, 0,045 %, 0,05 %, 0,055 %, 0,06 %, 0,065 %, 0,07 %, 0,075 %, 0,08 %, 0,085 %, 0,09 %, 0,095 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 % o más del 5 %, 5,5 %, 6 %, 6,5 %, 7 %, 7,5 %, 8 %, 8,5 %, 9 %, 9,5 % o más del 10 %. En una realización preferida, el extracto de levadura se aplica a una concentración de al menos el 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 % o el 1 %.

En algunas realizaciones, la fórmula de Colby se aplica para determinar si el uso de (a) y (b) en combinación muestra un efecto sinérgico: S. R. Colby, Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations, WEEDS 15, pág. 20-22 (1967).

La siguiente ecuación se usa para calcular la actividad esperada de mezclas que contienen dos principios activos, A y B:

$$\text{Esperada} = A + B - (A \times B/100)$$

en donde

A = eficacia observada del componente activo A (por ejemplo, una o más esporas microbianas de un agente de control biológico y más particularmente, una o más de esporas de *C. rosea* f. *catenulatum*) a la misma concentración que se usa en la mezcla;

B = eficacia observada del componente activo B (por ejemplo, glicina betaína y/o extracto de levadura) a la misma concentración que se usa en la mezcla.

E = efecto esperado (en porcentaje, %) de (a) + (b) a las tasas de aplicación a y b.

En la ecuación de Colby, el valor E corresponde al efecto (daño o lesión de la planta) que se espera si la actividad de los compuestos individuales es aditiva. Si el efecto observado es mayor que el valor E calculado de acuerdo con la ecuación de Colby, entonces se presenta un efecto sinérgico de acuerdo con la ecuación de Colby.

En algunas realizaciones, las combinaciones, combinaciones, composiciones y métodos divulgados en el presente documento son sinérgicos según se define mediante la ecuación de Colby. En algunas realizaciones, la acción conjunta de *C. rosea* f. *catenulata* J1446 (es decir, las esporas microbianas del agente de control biológico) y glicina betaína (es decir, los germinantes) o extracto de levadura da como resultado una actividad mejorada (a través de sinergia) contra un fitopatógeno (como, por ejemplo, contra *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Erysiphe* o *Venturia*). En una realización, las combinaciones, composiciones y métodos de la presente divulgación muestran una actividad antimicrobiana mejorada (o, por ejemplo, antifúngica) o plaguicida en comparación con la actividad antimicrobiana (o, por ejemplo, antifúngica) o plaguicida de los componentes cuando se aplican individualmente. En una realización adicional, las combinaciones, composiciones y métodos de la presente divulgación muestran una actividad antimicrobiana mejorada sinérgicamente (o, por ejemplo, antifúngica) o plaguicida en comparación con la actividad antimicrobiana o plaguicida (o, por ejemplo, antifúngica) de los componentes activos cuando se aplican individualmente. Más particularmente, se ha demostrado que el uso de la combinación de *C. rosea* f. *catenulata* J1446 (es decir, las esporas microbianas del agente de control biológico) y glicina betaína (es decir, los germinantes) muestra una actividad antifúngica mejorada en comparación con la actividad antifúngica de los componentes cuando se aplican

individualmente. Más particularmente, se ha demostrado que el uso de la combinación de *C. rosea* f. *catenulata* J1446 (es decir, las esporas microbianas del agente de control biológico) y glicina betaína (es decir, los germinantes) muestra una actividad mejorada contra *Botrytis* en comparación con la actividad de *C. rosea* f. *catenulata* J1446 o glicina betaína cuando se aplican individualmente. La combinación de *C. rosea* f. *catenulata* J1446 (es decir, las esporas microbianas del agente de control biológico) y glicina betaína (es decir, los germinantes) aumenta la eficacia de la protección contra el ataque por fitopatógenos al aumentar la germinación de las esporas y, por lo tanto, mejorando el crecimiento de hongos y la colonización de la planta o parte de una planta. En otras palabras, la presente divulgación demuestra una eficacia mejorada de *C. rosea* f. *catenulata* J1446 en el control biológico (o actividad fungicida) de hongos patógenos (por ejemplo, contra *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Erysiphe* o *Venturia*) aumentando la tasa de germinación de las esporas del hongo mediante el uso de un germinante. En una realización, y como se demuestra en el ejemplo, la combinación de la presente divulgación proporciona una actividad sinérgica en el control de dicho fitopatógeno o plaga.

En algunas realizaciones, las combinaciones, composiciones y métodos divulgados en el presente documento pueden, según los componentes individuales, usarse a tasas de aplicación más bajas para lograr un efecto fungicida comparable al efecto producido por los componentes individuales a tasas de aplicación normales.

En una realización, el uso de las combinaciones, composición o método de la presente divulgación también podría ser eficaz para controlar plagas de insectos y/o para aumentar la eficacia de la protección contra plagas de insectos. Por ejemplo, en este caso, la una o más esporas microbianas de un agente de control biológico se seleccionan por su capacidad contra insectos como, por ejemplo, los siguientes controles de agentes biológicos: *Beauveria bassiana* sensu lato (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch, *Isaria fumosorosea* Wise (anteriormente *Paecilomyces fumosoroseus*), *Isaria javanica* (*Cordyceps javanica*), *Lecanicillium longisporum* y *L. muscarium* (Petch) R. Zare y W. Gams (anteriormente *Verticillium lecanii*), o *Nomuraea rileyi* (Farl.) Samson. Por ejemplo, los resultados de la presente divulgación demuestran que la glicina betaína, extracto de levadura o una combinación de los mismos con *B. bassiana* o *C. javanica* presentan una actividad entomopatógena mejorada o superior en comparación con la eficacia del agente de control biológico sin el germinante (es decir, glicina betaína, extracto de levadura o una combinación de los mismos).

La combinación o composición de la presente divulgación puede incluir un portador y/o diluyente adecuado y puede proporcionarse en forma de un sólido, un polvo, una solución, dispersión, una suspensión, una pasta, un aerosol o un rociador, en donde los principios activos de la presente divulgación se formulan de una manera que se adapte a la aplicación específica. Los ejemplos de formulaciones adecuadas son: concentrados de emulsión, concentrados en suspensión, gránulos dispersables en agua y polvos humectables. El portador o diluyente, que es un portador o diluyente agrícola aceptable, puede ser uno o más de varios portadores que confieren una diversidad de propiedades, tales como mayor estabilidad, humectabilidad, dispersabilidad, etc. Los portadores adecuados pueden incluir, pero sin limitación, agua u otras soluciones acuosas, pastas, sólidos (por ejemplo, turba, trigo, salvado, vermiculita, suelo pasteurizado, etc.) o polvos secos. La composición o formulación puede incluir aditivos adicionales, incluyendo, pero sin limitación, aceites, agentes tamponantes, tensioactivos, adyuvantes o agentes de recubrimiento. La combinación o composición también puede comprender, por ejemplo, un agente de control biológico adicional, tal como un agente antifúngico o plaguicida (insecticida, fungicida, nematocida, bactericida o herbicida). La combinación de la una o más esporas microbianas de un agente de control biológico y uno o más germinantes se puede aplicar como una exposición de dosis única o en múltiples dosis o exposiciones en diferentes momentos.

El término "que comprende" en las reivindicaciones puede reemplazarse por "que consiste esencialmente en" o por "que consiste en", de acuerdo con la práctica estándar en el derecho de patentes.

El siguiente ejemplo sirve para describir y definir mejor la invención y no pretende limitar la invención de ninguna manera.

EJEMPLO 1: Se realizaron estudios para evaluar el efecto de la glicina betaína o el extracto de levadura junto con Prestop® (*C. rosea* f. *catenulata* J1446) en plantas de fresa

Materiales y métodos:

(a) Inoculación de plantas de fresa

Plantas jóvenes de fresa (*Fragaria X ananassa*; variedad "Merced") se dejaron crecer al menos una semana antes de que las plantas se seleccionaran para experimentos por su aspecto saludable y con hojas grandes hacia arriba. Se calculó que el recuento de esporas para *C. rosea* f. *catenulata* J1446 en el paquete de Prestop WG usado mediante hemocitómetro era de $1,4 \times 10^{10}$ esporas/g, se comprobó la viabilidad de las esporas usando el método MPN (número más probable) y se calculó que *C. rosea* f. *catenulata* J1446 era de 3×10^9 UFC/g. Los tratamientos se prepararon usando Prestop® WG al 0,025 % en Tween al 0,02 % con Folwin al 0,04 %, Folwin al 0,2 %, glicina betaína al 0,06 % (Intracell®, Lallemand), y glicina betaína al 0,6 % (Intracell®, Lallemand), así como Prestop WG al 0,025 % solo como control. Para rociar las plantas de fresa, se cargaron 10 ml de cada tratamiento en un kit Mastercraft Air Brush con el minicompressor ajustado a aproximadamente 0,10 MPa (15 psi). Para cada grupo de tratamiento, se rociaron 17 plantas con un movimiento circular durante 10 s. De media, se calculó la aplicación de 0,5 ml de tratamiento por planta. Cada

5 cubreobjetos (y la hoja a la que estaba unido) se retiró de cada planta después del rociado y el cubreobjetos se colocó en un tubo que contenía 1 ml de una suspensión de Tween al 0,02 % junto con tres perlas de vidrio de 3 mm. Para asegurar la homogeneización de la mezcla, los tubos se agitaron vorticialmente durante 30 s, se conectaron al agitador (220 rpm durante 10 min) y a continuación se agitaron vorticialmente de nuevo durante 10 s inmediatamente antes de cargarlo en un hemocitómetro para el recuento de esporas. El número de esporas obtenidas de cada cubreobjetos se contó usando un hemocitómetro para determinar la tasa de deposición. Las plantas se mantuvieron en el invernadero (Temp. prom. 24 °C, 41 °C de máxima, 15 °C de mínima, Prom. HR del 60 %) o en cámaras ambientales (Temp. prom. 28,8 °C, 30,9 °C de máxima, 25,2 °C de mínima, Prom. HR del 75 %) durante la duración del experimento que se está realizando. Las plantas para los estudios de germinación se mantuvieron a estas temperaturas durante 6, 7, 8 o 10 24 horas después del rociado antes de cortar los discos foliares. Las plantas usadas para los estudios de crecimiento de hifas se mantuvieron a estas temperaturas durante 1, 2, 3 o 6 d para dejar más tiempo a *C. rosea f. catenulata* J1446 para colonizar la superficie foliar antes de cortar los discos foliares. Las plantas usadas para visualizar la colonización se mantuvieron a estas temperaturas durante 3 y 6 días después del rociado antes de cortar los discos foliares. Las plantas se regaron cada dos días con aproximadamente 250 ml (1 taza) de agua por maceta. Todas las plantas se retiraron del invernadero en los 14 días posteriores al inicio del experimento; el corte de los discos foliares en algunos casos causó daños irreparables a la planta.

(b) Porcentaje de germinación de *C. rosea f. catenulata* J1446 en discos foliares de fresa

20 El mismo día, después del rociado, se cortaron dos discos foliares de 6 mm usando una perforadora de grapas esterilizada de dos hojas diferentes por planta de cinco plantas de fresa rociadas por grupo de tratamiento por período de tiempo (6, 7, 8 y 24 h) y a continuación se tñeron con 5 ul de azul de algodón de lactofenol. A continuación, los discos foliares teñidos se observaron bajo un microscopio compuesto con un aumento de 200x. Se eligieron al azar tres áreas de observación en cada disco foliar y se contaron 100 esporas: se registró el número que germinó (tubos germinales visibles al doble de la longitud de la espora) de esos 100. Se analizaron los porcentajes de germinación promedio por grupo de tratamiento y por período de tiempo.

(c) Crecimiento de hifas de *C. rosea f. catenulata* J1446 de discos foliares en placas de agar

30 Se cortaron dos discos foliares de 6 mm usando una perforadora de grapas esterilizada de dos hojas diferentes por planta de cinco plantas rociadas por tratamiento por período de tiempo (1, 2, 3 y 6 días después del rociado) y se colocaron con el lado adaxial hacia abajo sobre medio de agar paraquat-cloranfenicol (PCA) (0,1 ml de paraquat, 200 mg de cloranfenicol y 12 g de agar por litro de agua). Las placas de PCA que contenían discos foliares se incubaron a temperatura ambiente (± 23 °C) boca arriba a la derecha con luz parcial y se comprobó diariamente el crecimiento. Después del segundo día, las placas se dieron la vuelta para minimizar la condensación. El crecimiento alrededor del disco foliar se midió con una regla y se registró como diámetro promedio de crecimiento al día. Si los tratamientos tuvieron éxito en mejorar el crecimiento y la colonización de hongos en el disco foliar, entonces se esperaba que también crecieran anillos de crecimiento más grandes del hongo desde los discos foliares hasta las placas. Se analizaron los promedios en los tratamientos.

40 (d) Análisis estadísticos

i. Deposición de tratamientos sobre plantas de fresa

45 Los datos de deposición fueron normales cuando se analizó la distribución para estudios de cámaras ambientales y de invernadero. Los conjuntos de datos para ambas condiciones de crecimiento se analizaron usando un ANOVA unidireccional y se analizaron comparaciones múltiples de la media (alfa = 0,05) usando una prueba *post hoc* de Tukey.

50 ii. Germinación en discos foliares de fresa

Los datos para los ensayos de porcentaje de germinación en hojas de fresa fueron normales cuando se analizó la distribución para estudios de cámara ambiental y de invernadero. Por lo tanto, los conjuntos de datos para ambas condiciones de crecimiento se analizaron usando un ANOVA unidireccional y se analizaron comparaciones múltiples de la media (alfa = 0,05) usando una prueba *post hoc* de Tukey.

iii. Crecimiento de hifas en discos foliares de fresa sobre placas de agar

60 Los datos de los bioensayos de crecimiento de 1, 2, 3 y 6 días de incubación en invernadero fueron todos normales cuando se analizó la distribución. Los datos de los bioensayos de crecimiento de 1, 3 y 6 días de incubación en la cámara ambiental también fueron normales cuando se analizó la distribución. Por lo tanto, se analizaron conjuntos de datos de todos los períodos de incubación y condiciones de crecimiento usando un modelo mixto de medidas repetidas factoriales completo con los siguientes parámetros del modelo: tiempo, tratamiento y su interacción. Se analizaron múltiples comparaciones de la media (alfa = 0,05) usando una prueba *post hoc* de Tukey.

65

Resultados:

Porcentaje de germinación de *C. rosea f. catenulata* J1446 en discos foliares:

5 El porcentaje de germinación en el tiempo (figura 1) fue estadísticamente significativo $F(3,695) = 78,01$; $p < 0,0001$, ya que observamos una tendencia general de que la germinación aumentaba a medida que pasaba el tiempo. El porcentaje de germinación de esporas de *C. rosea* J1446 después de 24 h se aumentó mediante la adición de glicina betaína o extracto de levadura.

10 i. Estudios de invernadero

Los discos se cortaron después de que las plantas se incubaron en el invernadero durante diferentes períodos de tiempo (1 día, 2 días, 3 días, 6 días) y a continuación se controló el crecimiento en la placa durante 6 días (figura 2). La colonización de los discos foliares por *C. rosea* J1446 aumentó significativamente mediante la adición de glicina betaína o extracto de levadura.

15 **EJEMPLO 2:** Se realizaron experimentos en invernadero para demostrar la eficacia de la combinación de *C. rosea f. catenulata* J1446 y glicina betaína en el control de *Botrytis cinerea*.

20 Se cultivó *Botrytis cinerea* en caldo de patata dextrosa durante 1 a 2 semanas sin agitación. El micelio y las esporas resultantes se recuperaron para producir un inóculo líquido.

Plantas de tomate, variedad Admiro (fase: 3 hojas), se rociaron con el inóculo de *B. cinerea* (5000 roc./ml) y a continuación se dejaron secar. A continuación, los tratamientos se aplicaron rociando las plantas de tomate inoculadas.

25 Se probaron los siguientes tratamientos (9 repeticiones): (T1) Prestop® (*C. rosea f. catenulatum* J1446) al 0,003 %; (T2) Prestop® (*C. rosea f. catenulatum* J1446) al 0,003 % + glicina betaína (Intracell®, Lallemand) al 0,05 %; (T3) Prestop® (*C. rosea f. catenulatum* J1446) al 0,003 % + glicina betaína (Intracell®, Lallemand) al 0,2 %; (T4) glicina betaína (Intracell®, Lallemand) al 0,2 % y (T5) agua.

30 Las plantas se colocaron en un invernadero (Temp. prom. 24 °C, 41 °C de máxima, 15 °C de mínima, Prom. HR del 60 %) y se incubaron durante 5 días. El desarrollo de los síntomas se evaluó midiendo el tamaño del área necrótica (medición del ancho).

35 Como se muestra en la figura 3, la eficacia de Prestop® para controlar *B. cinerea* aumentó con la combinación con glicina betaína.

40 Se usó la ecuación de Colby para determinar los efectos esperados de los componentes, como se ha descrito anteriormente. Los resultados se midieron 5 días después de la aplicación de los componentes. Como se ha mostrado anteriormente, las muestras demostraron un efecto anti *Botrytis* sinérgico, con un control medido más alto de lo predicho por la ecuación de Colby (observado 91 > esperado 84,79).

EJEMPLO 3: Se realizaron experimentos en invernadero para demostrar la eficacia de tasas de dosis más bajas de *C. rosea f. catenulata* J1446 junto en el control de *Botrytis cinerea*.

45 El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia de protección de tasas de dosis más bajas de *C. rosea f. catenulata* J1446 junto con glicina betaína contra *Botrytis cinerea*.

50 El ensayo se realizó en plántulas de tomate jóvenes (variedad Admiro), susceptibles al moho gris. Las plantas se cultivaron en invernadero durante 3 semanas (hasta la fase de 2 hojas) antes de usarse para el ensayo.

El inóculo de *Botrytis cinerea* (hongo patógeno causante del moho gris del tomate) se obtuvo por multiplicación en medio de crecimiento PDA (agar de patata dextrosa).

55 Una vez que habían alcanzado la fase de dos hojas, las plantas se trataron con un rociador de vidrio (rociado foliar). Los productos (o agua para el control) se rociaron hasta que escurrieron.

El desarrollo de los síntomas del moho gris del tomate se ha evaluado midiendo el tamaño del área necrótica (medición del ancho).

60 El ensayo se organizó en 10 repeticiones independientes de una planta por modalidad.

Las diferentes modalidades se compararon con un control negativo tratado con agua.

65 Se probaron los siguientes tratamientos: (T1) agua; (T2) Prestop® (*C. rosea f. catenulatum* J1446) al 0,001 %; (T3) Prestop® (*C. rosea f. catenulatum* J1446) al 0,001 % + glicina betaína (Intracell®, Lallemand) al 0,08 %; (T4) Prestop® (*C. rosea f. catenulatum* J1446) al 0,001 % + glicina betaína (Intracell®, Lallemand) al 0,06 %; (T5) glicina betaína

(Intracell®, Lallemand) al 0,08 %; y (6) glicina betaína (Intracell®, Lallemand) al 0,06 %.

5 Los tratamientos se realizaron el día -1, la inoculación de *Botrytis cinerea* se realizó el día 0 y la evaluación de los síntomas se realizó el día +5. Las plantas se colocaron en un invernadero (Temp. prom. 24 °C, 41 °C de máxima, 15 °C de mínima, Prom. HR del 60 %). El desarrollo de los síntomas se evaluó midiendo el tamaño del área necrótica (medición del ancho en mm).

10 La figura 4 muestra la eficiencia de protección de los diferentes tratamientos en comparación con el control negativo. A las dos dosis ensayadas, la eficiencia de protección de la combinación de Prestop® y glicina betaína fue significativamente mayor que la de Prestop® o glicina betaína sola. Además, los valores observados y pronosticados según lo calculado mediante la ecuación de Colby: para el 0,08 % de glicina betaína: observado es 55,2 y esperado es 34,2; para el 0,06 % de glicina betaína: observado es 51,4 y esperado es 29,06.

15 **EJEMPLO 4:** Se realizó un estudio para demostrar la eficacia de la combinación de *C. rosea* f. *catenulata* J1446 junto con glicina betaína para inducir la resistencia de la vid al mildiú pulverulento (*Erysiphe necator*).

20 Los ensayos se realizaron en esquejes de vid herbáceos con de cuatro a cinco hojas adultas cultivadas en invernadero (variedad de uva Marselan) a razón de diez plantas por modalidad. El estudio consistió en tratar los esquejes de vid con los diferentes tratamientos, cuatro días antes de la inoculación y dos días después de la inoculación. Los tratamientos se aplicaron mediante rociado en ambos lados de las hojas hasta el punto de escorrentía.

25 La inoculación se realizó rociando una suspensión de 10⁵ conidios de mildiú pulverulento/ml sobre la superficie superior de las hojas. Los esquejes tratados e inoculados se colocaron en un invernadero. La incubación se realizó en condiciones: 25 °C durante el día y 18 °C durante la noche con un fotoperiodo de 18 horas hasta el final de la experimentación.

30 La eficacia de los diferentes tratamientos se evaluó a los 18 días después de la inoculación mediante la puntuación (estimación visual) del área infectada de hojas en las "filas" 1, 2 y 3 (primeras tres hojas "adultas" del ápice) en relación con un control sin tratar: 0 = sin infección; 1 = algunos puntos; 2 = algunas manchas pequeñas no contiguas; y 3 = manchas grandes, contiguas o no.

Los resultados se analizaron mediante un análisis de la varianza (alfa = 0,05) y las comparaciones múltiples de la media se analizaron mediante una prueba de Fisher LSD.

35 Se probaron los siguientes tratamientos: (T1) agua; (T2) glicina betaína (Intracell®, Lallemand) 0,5 g/l; (T3) Prestop® (*C. rosea* f. *catenulatum* J1446) 0,7 g/l + glicina betaína 0,5 g/l; y (T4) Prestop® (*C. rosea* f. *catenulatum* J1446) 0,7 g/l.

40 Los resultados se muestran en la figura 5. Se ha demostrado que la combinación de Prestop® y glicina betaína confería un efecto protector sobre el desarrollo de mildiú pulverulento cuyo efecto protector es estadísticamente significativo en comparación con los demás tratamientos. Se concluye que la glicina betaína aumenta la eficacia de Prestop® (*C. rosea* f. *catenulatum* J1446). También se observó un efecto sistémico parcial ya que el postratamiento formó hojas y las hojas anticipadas se desarrollaron después de los tratamientos fueron casi asintomáticos.

45 **EJEMPLO 5:** Se realizó un estudio para demostrar la eficacia de la combinación de Prestop® (*C. rosea* f. *catenulata* J1446) junto con glicina betaína para luchar contra *Rhizoctonia* y *Botrytis* sp. en cultivo de lechuga en condiciones de invernadero.

50 El ensayo se realizó en lechuga (variedad météore). Las lechugas se cultivaron en condiciones de invernadero contaminadas de manera natural por *Rhizoctonia* y *Botrytis* sp. con cuatro repeticiones para cada tratamiento. Cada parcela de tierra (40 lechugas por parcela) incluía cuatro hileras de 5 m de longitud y 1,32 m de ancho.

55 Se probaron los siguientes tratamientos: (T1) agua; (T2) Prestop® (*C. rosea* f. *catenulatum* J1446) al 0,025 %; y (T3) Prestop® (*C. rosea* f. *catenulatum* J1446) al 0,025 % + glicina betaína (Intracell®) al 0,6 %. La primera aplicación se realizó sumergiendo la lechuga en las soluciones durante 20 segundos. Las tres aplicaciones posteriores de los tratamientos sobre la lechuga se realizaron mediante rociado a razón de 500 l/ha sobre las hojas en tres aplicaciones posteriores.

60 La evolución de la frecuencia de la enfermedad se evaluó tres veces durante el desarrollo del cultivo (trasplante +10; +20; +30 días) y en la cosecha. La puntuación se realizó por presencia/ausencia de la enfermedad en 40 plantas de las cuatro filas. La intensidad y la gravedad de la enfermedad se evaluaron en la cosecha en 20 plantas de las cuatro filas siguiendo la escala dada: Grado 1: lechuga sana; Grado 2: ataque bajo, hojas de collar y básales infestadas; Grado 3: ataque fuerte, numerosas hojas infestadas; y Grado 4: ataque muy fuerte, lechugas no comercializables. Las lechugas comercializables son aquellas que se encuentran con una puntuación de 1 y 2.

65 Los resultados (comparación promedio de la frecuencia de la enfermedad y el rendimiento) se analizaron mediante un análisis de la varianza (alfa = 0,05). Se realizó una prueba de χ^2 sobre la intensidad y gravedad de *Botrytis* sp y

Rhizoctonia en la cosecha.

Las puntuaciones de fitotoxicidad se realizaron tres y siete días después de cada aplicación. En este ensayo no se encontraron síntomas de fitotoxicidad ni efectos sobre organismos no objetivo.

5 De acuerdo con el protocolo, la puntuación de frecuencia en 40 lechugas por parcela comenzó 10 días después de la siembra y 20 días, pero no se observó ningún síntoma. Los ataques de *Botrytis sp.* aparecieron en la tercera notación (plantación + 27 días). Después se hicieron dos puntuaciones.

10 Los resultados han indicado que el ataque de *Rhizoctonia* y *Botrytis* fue fuerte en el ensayo con aproximadamente el 100 % de lechugas infestadas en el control sin tratar (grado 2-4). El control presenta significativamente menos lechuga sana y más lechuga de grado 4 no comercializable (los resultados de Khi^2 están por debajo).

15 Como se indica en la Tabla 1, los tratamientos con Prestop junto con glicina betaína aumentan significativamente la cantidad de lechugas sanas.

Las pruebas de Khi^2 realizadas en la puntuación de intensidad de la pudrición del collar en la cosecha se pueden entender de acuerdo con estos códigos:

20 (+): recuento observado más alto que el recuento teórico

(-): recuento observado más bajo que el recuento teórico

NS: Khi^2 no significativo al umbral de 0,100

25 *: prueba de Khi^2 significativa al umbral de 0,100

** : prueba de Khi^2 significativa al umbral de 0,05

30 ***: prueba de Khi^2 significativa al umbral de 0,010

Tabla 1: Prueba Khi^2 sobre la intensidad de la "pudrición del collar" en la cosecha.

Tratamientos	Grado 1
T1 - Control	1 % (-) **
T2 - Prestop	12 % (+) *
T3 - Prestop® + glicina betaína	20 % (+) ***

35 **EJEMPLO 6:** Se realizó un estudio para evaluar la eficacia de la combinación de Prestop® (*C. rosea* f. *catenulata* J1446) junto con glicina betaína para reducir el inóculo de sarna del manzano (*Venturia inaequalis*) en un huerto de manzanos.

El ensayo se realizó en árboles en maceta de la variedad Gala. Se reservaron seis árboles por tratamiento para esta prueba.

40 Se probaron los siguientes tratamientos: (T1) agua; (T2) Prestop® (*C. rosea* f. *catenulatum* J1446) 250 g/ha + Silwet L-77 0,25 ml/l; (T3) Prestop® (*C. rosea* f. *catenulatum* J1446) 250 g/ha + glicina betaína (Intracell®, Lallemand) 300 g/ha; y (T4) glicina betaína (Intracell®, Lallemand) 300 g/ha. Se ensayaron los siguientes tratamientos: (a) Una aplicación cuatro días antes de la inoculación de patógenos; y (b) una primera aplicación cuatro días antes de la inoculación de patógenos y una segunda aplicación después de la inoculación de patógenos cuando se alcanzó un acumulado de 300 °C/hora después de la inoculación.

50 Se preparó una solución de conidios de *V. inaequalis* a partir de 2018 hojas con sarna almacenadas en el congelador. Los árboles se mantuvieron bajo bruma durante al menos una hora antes de la contaminación y a continuación al menos durante 12 horas después. La duración se adaptó según la temperatura y la humedad ambiente. El volumen de rociado se definió después de una prueba en blanco para cubrir suficiente vegetación sin llegar al punto de escorrentía (entre 30 y 50 ml/árbol). Los tratamientos se aplicaron con un rociador manual y se realizaron cuatro días antes de la inoculación con el patógeno (estrategias (a) y (b)) y dentro de los 300 °C/H después de la inoculación solo para la estrategia (2).

55 Se observó la frecuencia e intensidad de los síntomas foliares de sarna. La observación se realizó de cuatro a cinco días después del inicio de las primeras manchas, usando una escala de calificación de 0 a 4. Los árboles se puntuaron individualmente y se hicieron en todas las hojas de cada árbol.

60 Los resultados se muestran en la Tabla 2 y el tratamiento "Prestop® + glicina betaína" (una aplicación antes de la inoculación o una aplicación antes y una a 300 °H después) disminuyó el número promedio de hojas con sarna en un 8 a un 9 % en comparación con el control tratado con agua. En este experimento, se incluye Silwet como adyuvante.

Tabla 2: Frecuencia de aparición de síntomas foliares de sarna.

Número de aplicaciones	Frecuencia de los síntomas foliares de la sarna	
Una aplicación cuatro días antes de la inoculación con el patógeno	Agua	63,0 %
	Prestop® (<i>C. rosea</i> f. <i>catenulatum</i> J1446) 250 g/ha + Silwet L-77 0,25 ml/l	70,5 %
	Prestop® (<i>C. rosea</i> f. <i>catenulatum</i> J1446) 250 g/ha + glicina betaína 300 g/ha	53,8 %
	Glicina betaína 300 g/ha	59,6 %
Una aplicación cuatro días antes de la inoculación con el patógeno + una segunda aplicación después de la inoculación del patógeno cuando se alcanza un acumulado de 300 °C/hora después de la inoculación	Agua	56,1 %
	Prestop® (<i>C. rosea</i> f. <i>catenulatum</i> J1446) 250 g/ha + Silwet L-77 0,25 ml/l	56,6 %
	Prestop® (<i>C. rosea</i> f. <i>catenulatum</i> J1446) 250 g/ha + glicina betaína 300 g/ha	47,9 %
	Glicina betaína 300 g/ha	58,5 %

5 **EJEMPLO 7:** Se realizó un estudio para evaluar el efecto de la glicina betaína, extracto de levadura o una combinación de los mismos sobre la mejora de la tasa de germinación de conidios de *Beauveria bassiana*.

En el estudio se usó una cepa de *B. bassiana* (Granada, Lallemand).

10 Los conidios de *B. bassiana* se diluyeron en agua destilada estéril que contenía Tween 80 (0,05 %). La concentración de los tratamientos aplicados fue de 1×10^6 UFC/ml.

15 Glicina betaína (Intracell®, Lallemand; 0,2 % en 100 l/ha de mezcla de rociado) (T2), extracto de levadura (FNI, Lallemand; 0,2 % en 100 l/ha de mezcla de rociado) (T3) y una combinación de glicina betaína (Intracell®, Lallemand; 0,2 % en 100 l/ha de mezcla de rociado) y extracto de levadura (FNI, Lallemand; 0,2 % en 100 l/ha de mezcla de rociado) (T4) se ensayaron para estimular la germinación de conidios de *B. beauveria*.

20 Los conidios de *B. bassiana* se emparejaron con los tres tratamientos mencionados anteriormente en una relación de 1:1. Se usó como control negativo (T1) la suspensión de solo conidios de *B. bassiana* en agua destilada estéril sembrada en agua-agar. Se realizaron seis repeticiones por tratamiento.

25 Se colocaron cien µl de suspensión por combinación (seis réplicas) en placas de Petri que contenían agua-agar (15 g/l). Las placas se incubaron a 25 °C en la oscuridad. La evaluación de las tasas de germinación y el alargamiento del tubo germinativo se realizó con un microscopio óptico (con un aumento de 40x) después de cuatro, ocho, 12 y 16 horas de incubación.

Los datos se sometieron a pruebas de normalidad y homogeneidad (prueba de Shapiro-Wilk y Bartlett). Una vez que cumplieron con los principios, se sometió a análisis estadístico ANOVA de la varianza y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Se usó el software estadístico R Studio versión 1.2.1335.

30 Como se muestra en la Tabla 3, la adición de glicina betaína, el extracto de levadura o una combinación de los mismos aumentó significativamente la tasa de germinación de los conidios de *B. bassiana*.

Tabla 3: Número de conidios de *B. bassiana* germinados en suspensiones que contienen mezclas de conidios con las sustancias ensayadas que se incubaron juntas durante 16 horas a 25 °C.

n.	Tratamientos	Promedio de conidios germinados (%) por hora							
		4 h		8 h		12 h		16 h	
T1	<i>B. bassiana</i> : - agua-agar (control negativo)	0,00	NS	5,67	B*	31,00	B	56,50	C
T2	<i>B. bassiana</i> + glicina betaína	0,00		3,83	B	33,00	B	71,17	B
T3	<i>B. bassiana</i> + extracto de levadura	0,00		6,00	B	40,83	B	74,67	AB
T4	<i>B. bassiana</i> + glicina betaína + extracto de levadura	0,00		9,00	B	41,50	B	70,50	B

NS: No significativo
*Las medias seguidas de la misma letra no difieren significativamente entre sí según la prueba de Tukey ($P > 0,05$).

35 Se realizó un bioensayo para evaluar la eficacia de la combinación de *B. bassiana* con glicina betaína, extracto de levadura o la combinación de glicina betaína con extracto de levadura en el control de la mosca blanca (*Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemipteros: *Aleyrodidae*).

40 Los tratamientos ensayados fueron los siguientes: (T1) Tween 80 al 0,05 % (control negativo); (T2) *B. bassiana*

(Granada, Lallemand) (control positivo); (T3) *B. bassiana* + glicina betaína al 0,2 % (Intracell®, Lallemand); (T4) *B. bassiana* + extracto de levadura al 0,2 % (FNI, Lallemand); y (T5) *B. bassiana* junto con glicina betaína al 0,2 % (Intracell®, Lallemand) y extracto de levadura al 0,2 % (FNI, Lallemand). Se realizaron siete repeticiones por tratamiento.

5 Los conidios de *B. bassiana* se diluyeron en agua destilada estéril que contenía Tween 80 (0,05 %). La concentración de los tratamientos aplicados fue de 2×10^7 UFC/ml. Los conidios de *B. bassiana* se emparejaron con los tratamientos mencionados anteriormente en una relación de 1:1.

10 Las plantas de judía (en fase de dos hojas) se infestaron con moscas blancas adultas. Después de la oviposición en las plantas durante un período de 24 horas, se retiraron los adultos y las plantas se trasladaron a una habitación separada para el desarrollo de las ninfas hasta la segunda fase. A continuación, la superficie abaxial de las hojas de judía se roció con los diferentes tratamientos con ayuda de un aerógrafo. Las plantas se mantuvieron en un invernadero (temperatura comprendida entre 14 °C y 30 °C) y se evaluó la mortalidad.

15 Los datos se sometieron a pruebas de normalidad y homogeneidad (prueba de Shapiro-Wilk y Bartlett), se realizó un análisis de desviación y se compararon las medias mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Se usó el software estadístico R Studio versión 1.2.1335.

20 Como se muestra en la Tabla 4, los resultados indican que existe una actividad entomopatógena superior cuando *B. bassiana* se combina con glicina betaína, extracto de levadura o una combinación de glicina betaína con extracto de levadura en comparación con los controles.

Tabla 4: Promedio de mortalidad de ninfas (en %) 10 días después de la aplicación de los tratamientos

n.	Tratamientos	Promedio de mortalidad de ninfas (%) 10 días después de la aplicación
T1	Tween 80 al 0,05 % (control negativo)	2,52c
T2	<i>B. bassiana</i> (Granada, Lallemand) (control positivo)	3,53c
T3	<i>B. bassiana</i> + glicina betaína	9,33b
T4	<i>B. bassiana</i> + extracto de levadura	16,42a
T5	<i>B. bassiana</i> + glicina betaína + extracto de levadura	11,26b

*Las medias seguidas de la misma letra no difieren significativamente entre sí según la prueba de Tukey ($P > 0,05$).

25 **EJEMPLO 8:** Se realizó un estudio para evaluar el efecto de la glicina betaína, extracto de levadura o una combinación de los mismos sobre la mejora de la tasa de germinación de conidios de *Cordyceps javanica*.

30 Los conidios de *C. javanica* se diluyeron en agua destilada estéril que contenía Tween 80 (0,05 %). La concentración de los tratamientos aplicados fue de 1×10^6 UFC/ml.

35 Glicina betaína (Intracell®, Lallemand; 0,2 % en 100 l/ha de mezcla de rociado) (T2), extracto de levadura (FNI, Lallemand; 0,2 % en 100 l/ha de mezcla de rociado) (T3) y una combinación de glicina betaína (Intracell®, Lallemand; 0,2 % en 100 l/ha de mezcla de rociado) y extracto de levadura (FNI, Lallemand; 0,2 % en 100 l/ha de mezcla de rociado) (T4) se ensayaron para estimular la germinación de conidios de *C. javanica*.

40 Los conidios de *C. javanica* se emparejaron con los tres tratamientos mencionados anteriormente en una relación de 1:1. Se usó como control negativo (T1) la suspensión de solo conidios de *C. javanica* en agua destilada estéril sembrada en agua-agar.

45 Se colocaron cien µl de suspensión por combinación (seis réplicas) en placas de Petri que contenían agua-agar (15 g/l). Las placas se incubaron a 25 °C en la oscuridad. La evaluación de las tasas de germinación y el alargamiento del tubo germinativo se realizó con un microscopio óptico (con un aumento de 40x) después de cuatro, ocho y 12 horas de incubación.

Los datos se sometieron a pruebas de normalidad y homogeneidad (prueba de Shapiro-Wilk y Bartlett). Una vez que cumplieron con los principios, se sometió a análisis estadístico ANOVA de la varianza y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey ($p < 0,05$). Se usó el software estadístico R Studio versión 1.2.1335.

50 Como se muestra en la Tabla 5, la adición de glicina betaína, el extracto de levadura o una combinación de los mismos aumentó la tasa de germinación de los conidios de *C. javanica*. Los resultados indicaron que la germinación de los conidios se estimuló más fuertemente por el extracto de levadura y la combinación de glicina betaína y extracto de levadura.

55 Tabla 5: Número de conidios de *C. javanica* conidia germinados en suspensiones que contienen mezclas de conidios con las sustancias ensayadas que se incubaron juntas durante 12 horas a 25 °C.

n.	Tratamientos	Promedio de conidios germinados (%) por hora					
		4 h		8 h		12 h	
T1	<i>C. javanica</i> (Control negativo)	0,00	ns*	22,5	C	85,67	C
T2	<i>C. javanica</i> + glicina betaína	0,00		53	B	88,5	BC
T3	<i>C. javanica</i> + extracto de levadura	0,00		82,5	A	93,17	AB
T4	<i>C. javanica</i> + glicina betaína + extracto de levadura	0,00		84,5	A	93,5	AB

NS: No significativo
 *Las medias seguidas de la misma letra no difieren significativamente entre sí según la prueba de Tukey (P> 0,05).

Se realizó un bioensayo para evaluar la eficacia de la combinación de *C. javanica* con extracto de levadura o la combinación de glicina betaína con extracto de levadura en el control de la mosca blanca (*Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemípteros: *Aleyrodidae*).

5 Los tratamientos ensayados fueron los siguientes: (T1) Tween 80 al 0,05 % (control negativo); (T2) *C. javanica* (control positivo); (T3) *C. javanica* + extracto de levadura al 0,2 % (FNI, Lallemand); y (T4) *C. javanica* + glicina betaína al 0,2 % (Intracell[®], Lallemand) + extracto de levadura al 0,2 % (FNI, Lallemand). Se realizaron siete repeticiones por tratamiento.

10 Los conidios de *C. javanica* se diluyeron en agua destilada estéril que contenía Tween 80 (0,05 %). La concentración de los tratamientos aplicados fue de 2×10^7 UFC/ml. Los conidios de *C. javanica* se emparejaron con los tratamientos mencionados anteriormente en una relación de 1:1.

15 Las plantas de judía (en fase de dos hojas) se infestaron con moscas blancas adultas. Después de la oviposición en las plantas durante un periodo de 24 horas, las plantas se trasladaron a una habitación separada para el desarrollo de las ninfas hasta la segunda fase. A continuación, la superficie abaxial de las hojas de judía se roció con los diferentes tratamientos con ayuda de un aerógrafo. Las plantas se mantuvieron en un invernadero (temperatura comprendida entre 14 °C y 30 °C) y se evaluó la mortalidad.

20 Los datos se sometieron a pruebas de normalidad y homogeneidad (prueba de Shapiro-Wilk y Bartlett), un análisis de desviación y se compararon las medias mediante la prueba de Tukey (p <0,05). Se usó el software estadístico R Studio versión 1.2.1335.

25 Como se muestra en la Tabla 6, los resultados indican que hay una actividad entomopatogena superior cuando *C. javanica* se combina con extracto de levadura o extracto de levadura junto con glicina betaína en comparación con los controles.

Tabla 6: Promedio de mortalidad de ninfas (en %) 7 días después de la aplicación de los tratamientos

n.	Tratamientos	Promedio de mortalidad de ninfas (%) 7 días después de la aplicación
T1	Tween 80 al 0,05 % (control negativo)	1,68d
T2	<i>C. javanica</i> (control positivo)	10,05c
T3	<i>C. javanica</i> + extracto de levadura	37,18a
T4	<i>C. javanica</i> + glicina betaína + extracto de levadura	17,28b

*Las medias seguidas de la misma letra no difieren significativamente entre sí según la prueba de Tukey (P> 0,05).

30 **EJEMPLO 9:** Se realizó un estudio para evaluar el efecto del extracto de levadura en la mejora de la tasa de germinación conidial de *Trichoderma asperellum* (Quality[®], Lallemand).

35 Se realizó una prueba de laboratorio. Se evaluaron los siguientes tratamientos (incluidas tres repeticiones): (T1) *T. asperellum* (Quality, Lallemand) solo, 1 g/kg de semillas; y (T2) *T. asperellum*, 1 g/kg de semillas + extracto de levadura (FNI, Lallemand), 1 g/kg de semillas que corresponde a una concentración del 0,001 %.

40 Se pesaron semillas de soja y se usaron 500 g de semillas por tratamiento. Los productos se diluyeron en agua destilada y las semillas se inocularon mediante rociado. Después de los tratamientos, las semillas se almacenaron en un ambiente fresco y ventilado.

45 Después de la incubación de semillas, se evaluó el porcentaje de germinación de conidios viables. Se pesaron dos muestras de 100 g (16,67 g en promedio) de semillas inoculadas y se distribuyeron en dos Erlenmeyer con una solución de dilución estéril (NaCl al 0,9 %-Tween al 0,1 %), formando la dilución 0. Los viales se agitaron durante 20-30 minutos a 240 rpm. Las diluciones se realizaron en serie, las soluciones fueron placas en PDA y las placas de Petri

se incubaron a 25 °C durante 7 días.

5 Para la evaluación de la viabilidad de conidios (en %), las semillas se lavaron con una solución isotónica y la solución resultante se homogeneizó en un vórtice durante 10-20 segundos. La suspensión se diluyó según se requirió y se colocó en placas de Petri que contenían medio BDA acidificado 1/5. Esta etapa se repitió cinco veces para cada punto temporal: 0, 3 h, 6 h, 12 h, 16 h, 20 horas después de la incubación. Las placas se incubaron 25°C.

10 La evaluación de la viabilidad se realizó usando un microscopio óptico. Las esporas consideradas viables son aquellas que tienen un tubo germinativo igual o mayor que la espóra; las esporas activas pero no germinadas son aquellas que se hinchan pero no forman un tubo germinativo; y las esporas no viables son aquellas que no se hinchan, no manchan con la solución de pigmento ni tienen un color muy pobre comparado con las hinchadas.

Las esporas que habían germinado se calcularon usando la siguiente fórmula:

15
$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{\text{promedio de conidios viables}}{\text{promedio de conidios inactivos} + \text{promedio de conidios viables}} \times 100$$

20 Los datos generados se sometieron a pruebas de normalidad y homogeneidad (prueba de Shapiro-Wilk y Bartlett). Una vez que se cumplieron estos principios, se sometieron a análisis estadístico de la varianza ANOVA y prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). Para los datos que no cumplieron los principios, se sometieron a una prueba de análisis de la desviación y se compararon las medias mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$). Se usó el software estadístico R Studio versión 1.2.1335.

25 Como se muestra en la Tabla 7, el porcentaje de germinación de conidios de *T. asperellum* aumentó significativamente con la adición de extracto de levadura.

Tabla 7: Porcentaje de conidios de *T. asperellum* germinados en suspensiones que contienen mezclas de conidios con las sustancias analizadas que se incubaron juntas durante 20 horas a 25 °C.

Tratamientos	3 horas	6 horas	12 horas	16 horas	20 horas
<i>T. asperellum</i> (Quality®, Lalemand)	0	0	1,83 % de b	47,5 % de b	49,5 % de b
<i>T. asperellum</i> (Quality®, Lalemand) + extracto de levadura	0	0	24,83 % de a	54,5 % de a	56,5 % de a

Las medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente entre sí según la prueba de Tukey al 5 % de significación.

30 Se realizó un ensayo en un invernadero para evaluar si la presencia de extracto de levadura también aumentaría el efecto de bioestimulación de *T. asperellum*.

35 Las semillas de soja se trataron como se ha mencionado anteriormente. La siembra se realizó el mismo día del tratamiento de la semilla, permitiendo aproximar la realidad del campo y ofrecer condiciones favorables para la supervivencia de los microorganismos. Cada unidad experimental consistía en dos macetas de cuatro litros que contenían arena. En cada maceta se sembró una semilla de soja con una profundidad de dos cm (recomendada para cultivo).

40 El porcentaje del número de plántulas emergidas se realizó diariamente hasta los diez días de evaluación y se calculó el índice de velocidad de germinación según Maguire (1962).

45 El experimento se realizó hasta que las plantas alcanzaron el ciclo vegetativo V2 (25 días). Al final de este período, las plantas se recolectaron y se lavaron con agua corriente para minimizar la pérdida de raíces delgadas. El volumen de la raíz, la longitud de la parte aérea, la parte aérea fresca y la masa de la raíz y la masa seca de la raíz y la parte aérea se realizaron de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

50 Se realizó un ANOVA seguido de una prueba de Tukey para determinar la longitud de la parte aérea, masa fresca de la parte aérea, masa de raíz fresca y masa de parte aérea seca. También se realizaron análisis de desviación (distribución gamma) seguidos de la prueba de Tukey para determinar el índice de velocidad de emergencia, el volumen de la raíz (ml) y la masa de raíz seca (cm). Se usó el software R Studio versión 1.2.1335 para todos los análisis estadísticos.

55 Los resultados demostraron que las semillas recubiertas con *T. asperellum* y extracto de levadura proporcionaron la masa de raíz seca más alta en comparación con las semillas de soja tratadas solo con *T. asperellum* (Tabla 8). Esto demostró que la presencia de extracto de levadura aumenta el efecto de bioestimulación de *T. asperellum*.

Tabla 8: Efecto bioestimulador de *T. asperellum* en soja

Tratamientos	Masa de raíz seca (g)
Agua	0,16 c
<i>T. asperellum</i> (Quality, Lalemand)	0,22 a
<i>T. asperellum</i> (Quality, Lalemand) + extracto de levadura	0,35 b

Las medias con las mismas letras no difieren según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$)

REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar la tasa de germinación de una espora fúngica, que comprende poner en contacto con un hospedador: (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen al género *Chlonostachys*, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Serendipita* o *Trichoderma*, y combinaciones de los mismos, y (b) uno o más germinantes, en donde dicho uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos.
2. El método de la reivindicación 1, en donde:
- (i) al entrar en contacto la una o más esporas fúngicas y el uno o más germinantes con el hospedador, la una o más esporas fúngicas del agente biológico o agente de control biológico exhiben una mayor germinación de esporas en comparación con el contacto de una o más esporas fúngicas con el hospedador sin el uno o más germinantes; y/o
- (ii) el hospedador es el suelo, una plaga, una planta o una parte de una planta, opcionalmente, en donde: la parte de una planta comprende o consiste en una semilla; y/o el contacto comprende de manera foliar a la planta o parte de una planta la una o más esporas fúngicas de un agente de control biológico y el uno o más germinantes.
3. Un método para: controlar un fitopatógeno o una plaga o proteger una planta de un fitopatógeno o una plaga, en donde el fitopatógeno es un hongo o la plaga es una plaga de insectos, comprendiendo dicho método poner en contacto el suelo, una plaga, una planta o una parte de una planta con (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen al género *Chlonostachys*, *Beauveria* o *Cordyceps*, y combinaciones de los mismos, y (b) uno o más germinantes, en donde dicho uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos; o mejorar el crecimiento, desarrollo y/o productividad de una planta, comprendiendo dicho método poner en contacto el suelo, una plaga, una planta o una parte de una planta con (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen al género *Serendipita* o *Trichoderma*, y combinaciones de los mismos, y (b) uno o más germinantes, en donde dicho uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos.
4. Un método para mejorar la eficacia de un agente biológico o agente de control biológico, comprendiendo dicho método poner en contacto el suelo, una plaga, una planta o una parte de una planta con (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen al género *Chlonostachys*, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Serendipita* o *Trichoderma*, y combinaciones de los mismos, y (b) uno o más germinantes, en donde dicho uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos.
5. El método de la reivindicación 3 o 4, en donde, al entrar en contacto la una o más esporas fúngicas y el uno o más germinantes con el suelo, la plaga, la planta o la parte de una planta, la una o más esporas fúngicas del agente de control biológico exhiben una mejor eficacia en la inhibición de fitopatógenos o exhiben un mayor control de plagas en comparación con el contacto de una o más esporas fúngicas con el hospedador sin el uno o más germinantes, o la una o más esporas fúngicas del agente biológico exhiben una mejor eficacia en la mejora del crecimiento, desarrollo y/o productividad de las plantas, opcionalmente, en donde:
- (i) la mejora del crecimiento, el desarrollo y/o la productividad de una planta comprende mejorar al menos uno de los siguientes: el grado de micorrización, el enraizamiento de la planta, el crecimiento de la planta, la altura de la planta, el florecimiento de la planta, la biomasa fresca de la planta, la biomasa seca de la planta, el rendimiento de la planta, la nutrición de la planta, la resistencia de la planta a los estreses abióticos y combinaciones de los mismos; y/o
- (ii) la parte de una planta comprende o consiste en una semilla.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde el contacto comprende de manera foliar a la planta o parte de una planta la una o más esporas fúngicas de un agente de control biológico y el uno o más germinantes.
7. Un método para fabricar una composición que comprende mezclar (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen al género *Chlonostachys*, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Serendipita* o *Trichoderma*, y combinaciones de los mismos, y (b) uno o más germinantes para obtener una composición que comprenda (a) la una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico y (b) el uno o más germinantes, en donde dicho uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos, opcionalmente, en donde:

- (i) el método comprende además mezclar la (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico y (b) uno o más germinantes con (c) un portador para obtener una composición que comprenda (a) la una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, (b) el uno o más germinantes y (c) el portador; y/o
- (ii) dicha composición es para controlar un fitopatógeno o una plaga o mejorar el crecimiento, desarrollo y/o productividad de una planta.
8. Un composición para controlar un fitopatógeno o una plaga o mejorar el crecimiento, desarrollo y/o productividad de una planta, en donde la composición comprende (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen al género *Chlonostachys*, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Serendipita* o *Trichoderma*, y combinaciones de los mismos; y (b) uno o más germinantes, en donde dicho uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos; comprendiendo además, opcionalmente, (c) un portador.
9. Uso de una cantidad eficaz de (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o un agente de control biológico, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen al género *Chlonostachys*, *Beauveria*, *Cordyceps*, *Serendipita* o *Trichoderma*, y combinaciones de los mismos, y (b) uno o más germinantes para mejorar la tasa de germinación de la una o más esporas fúngicas de un agente biológico o un agente de control biológico, en donde dicho uno o más germinantes comprenden glicina betaína, un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos, opcionalmente, en donde el uso:
- (i) mejora la tasa de germinación de la una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico controlando de este modo un fitopatógeno o plaga o mejorando el crecimiento y el desarrollo y/o productividad de una planta;
- (ii) mejora la tasa de germinación y la actividad antimicrobiana o la actividad plaguicida de la una o más esporas fúngicas del agente de control biológico en comparación con la tasa de germinación y la actividad antimicrobiana o la actividad plaguicida de la una o más esporas fúngicas de un agente de control biológico cuando se usan sin el uno o más germinantes; y/o
- (iii) mejora la tasa de germinación y la eficacia en la mejora del crecimiento de las plantas, el desarrollo y/o la productividad de la una o más esporas fúngicas del agente biológico en comparación con la tasa de germinación y la eficacia en la mejora del crecimiento, desarrollo y/o productividad de las plantas de la una o más esporas fúngicas del agente de control biológico cuando se usan sin el uno o más germinantes.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, la composición de la reivindicación 8, o el uso de la reivindicación 9, en donde el uno o más germinantes comprenden:
- (i) glicina betaína;
- (ii) un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos, preferentemente, en donde el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura; o
- (iii) una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura, levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos, preferentemente, en donde el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y 10, la composición de la reivindicación 8 y 10, o el uso de la reivindicación 9 y 10, en donde la una o más esporas fúngicas pertenecen a las especies *Chlonostachys rosea* var. *catenulatum*, *Beauveria bassiana*, *Cordyceps javanica*, *Trichoderma asperellum*, o combinaciones de las mismas, , opcionalmente, en donde la una o más esporas fúngicas son:
- (i) una o más esporas fúngicas entomopatógenas, opcionalmente, en donde la una o más esporas fúngicas entomopatógenas son una o más esporas fúngicas entomopatógenas de *Beauveria bassiana*, *Cordyceps javanica*, o combinaciones de las mismas; y/o
- (ii) uno o más conidios o clamidosporas; o
- (iii) una o más esporas fúngicas de *Chlonostachys rosea* var. *catenulatum*, opcionalmente, en donde *Chlonostachys rosea* var. *catenulatum* es *C. rosea* f. *catenulata*, opcionalmente, en donde *C. rosea* f. *catenulata* es de la cepa J1446.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, 10 y 11, la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8, 10 y 11, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en donde:
- (i) la una o más esporas fúngicas de un agente de control biológico con una o más esporas de *C. rosea* f. *catenulata* y el uno o más germinantes comprenden glicina betaína, opcionalmente, en donde *C. rosea* f. *catenulata* es de la

cepa J1446;

(ii) la una o más esporas fúngicas de un agente de control biológico son una o más esporas de *C. rosea f. catenulata* y el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura o levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos, preferentemente, en donde el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura y, opcionalmente, en donde *C. rosea f. catenulata* es de la cepa J 1446;

(iii) la una o más esporas fúngicas de un agente de control biológico son una o más esporas de *C. rosea f. catenulata* y el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura o levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos, preferentemente, en donde el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura, y opcionalmente, en donde *C. rosea f. catenulata* es de la cepa J1446;

(iv) la una o más esporas fúngicas de un agente de control biológico son una o más esporas de *Beauveria bassiana* y el uno o más germinantes comprenden glicina betaína;

(v) la una o más esporas fúngicas de un agente de control biológico son una o más esporas de *Beauveria bassiana* y el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura o levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos, preferentemente, en donde el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura;

(vi) la una o más esporas fúngicas de un agente de control biológico son una o más esporas de *Beauveria bassiana* y el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura o levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos, preferentemente, en donde el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura;

(vii) la una o más esporas fúngicas de un agente de control biológico son una o más esporas de *Cordyceps javanica* y el uno o más germinantes comprenden glicina betaína;

(viii) la una o más esporas fúngicas de un agente de control biológico son una o más esporas de *Cordyceps javanica* y el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura o levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos, preferentemente, en donde el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura;

(ix) la una o más esporas fúngicas de un agente de control biológico son una o más esporas de *Cordyceps javanica* y el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura o levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos, preferentemente, en donde el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura;

(x) la una o más esporas fúngicas de un agente biológico son una o más esporas de *Trichoderma asperellum* y el uno o más germinantes comprenden glicina betaína;

(xi) la una o más esporas fúngicas de un agente biológico son una o más esporas de *Trichoderma asperellum* y el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura o levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos, preferentemente, en donde el uno o más germinantes comprenden un extracto de levadura; o

(xii) la una o más esporas fúngicas de un agente biológico son una o más esporas de *Trichoderma asperellum* y el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura o levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o un derivado de combinación de los mismos, preferentemente, en donde el uno o más germinantes comprenden una combinación de glicina betaína y un extracto de levadura.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y 10-12, la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 y 10-12, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en donde:

A) el hongo pertenece al género *Botrytis*, *Erysiphe*, *Rhizoctonia*, *Venturia*, *Didymella*, *Fusarium*, *Pseudoidium*, *Podosphaera* y combinaciones de los mismos, opcionalmente, en donde:

(i) el hongo pertenece al género *Botrytis*, preferentemente, en donde el hongo es *Botrytis cinerea*;

(ii) el hongo pertenece al género *Erysiphe*, preferentemente, en donde el hongo es *Erysiphe necator*;

(iii) el hongo pertenece al género *Rhizoctonia*, preferentemente, en donde el hongo es *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia bataticola*; *Rhizoctonia fragariae*; *Rhizoctonia leguminicola* o *Rhizoctonia oryzae*, preferentemente, en donde el hongo es *Rhizoctonia solani*;

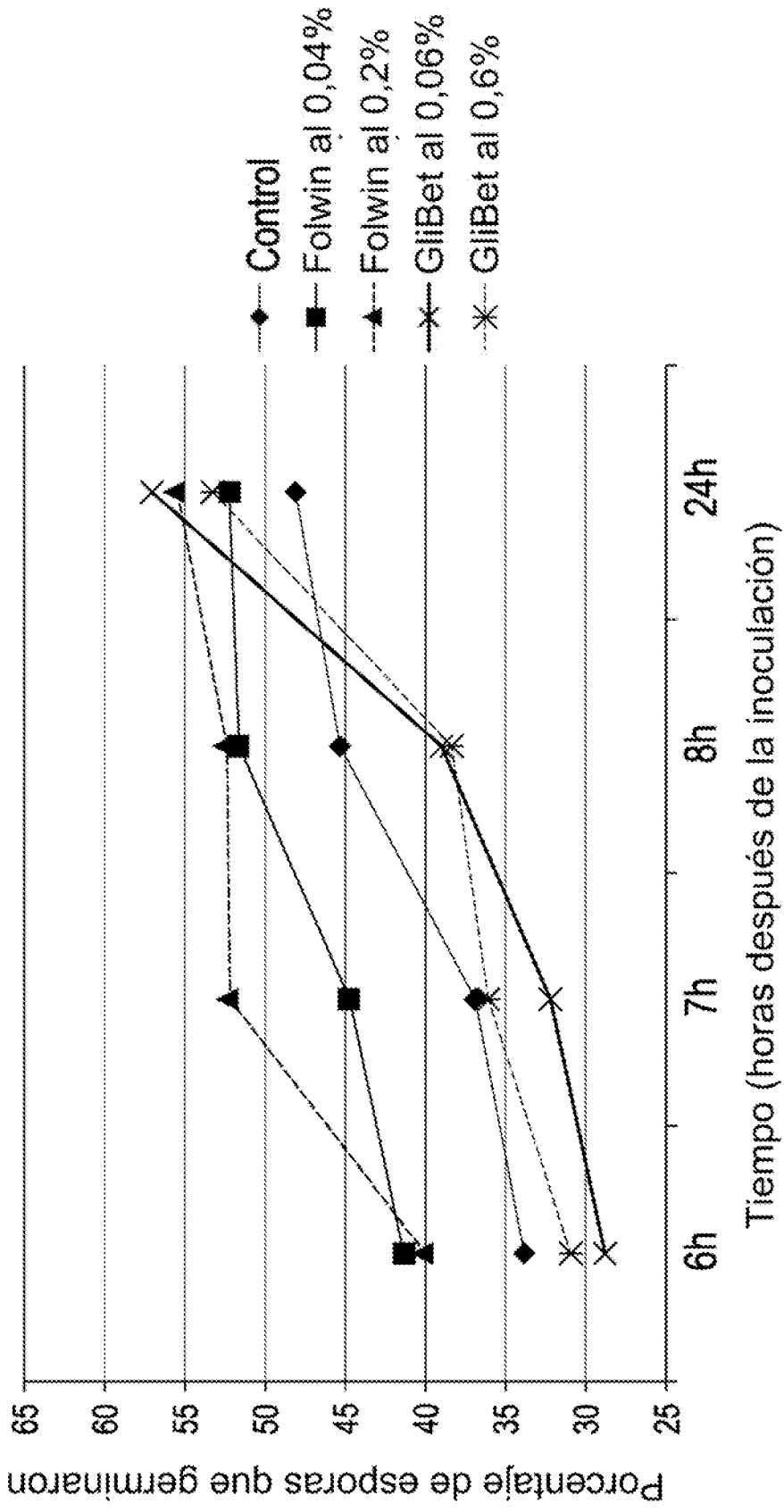
(iv) el hongo pertenece al género *Venturia*, preferentemente, en donde el hongo es *Venturia inaequalis*;

(v) el hongo pertenece al género *Pseudoidium*, preferentemente, en donde el hongo es *Pseudoidium neolycopersici*; o

(vi) el hongo pertenece al género *Podosphaera*, preferentemente, en donde el hongo es *Podosphaera xanthii*;

B) la plaga de insectos pertenece a la especie *Diuraphis noxia*, *Bemisia argentifolii*, *Bemisia tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Aleyrodes loniceræ*, *Diaphorina citri*, *Euphyllura olivine*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulacorthum solani*, *Heliethrips haemorrhoidalis*, *Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella*

- 5 *schulzei*, *Thrips tabaci*, *Scirtothrips dorsalis*, *Hercinothrips femoralis*, *Daibulus maidis*, *Phenacoccus solenopsis*, *Pseudococcus longispinus*, *Paracoccus marginatus*, *Mahanarva fimbriolata*, *Deois flavopicta*, *Zulia entreriana*, *Notozulia entreriana*, *Hypothenemus hampei*, *Hedypathes betulinus*, *Cosmopolites sordidus*, *Gonipterus scutellatus*, *Agriotes spp.*, *Plutella xylostella*, *Helicoverpa armigera*, *Otiorrhynchus sultacus*, *Fungus gnats*, *Exomala orientalis*, *Sciaridae*, *Otiorrhynchus sulcatus*, *Strophosoma melanogrammum*, *S. capitatum*, *Phyllopertha horticola*, *Amphimallon solstitialis*, *Daktulosphaira vitifoliae*, *Diabrotica virgifera* *Spodoptera spp*, *Oligonychus ilicis*, *Planococcus citri*, *Anthonomus grandis*, *Brevicoryne brassicae* o *Sphenophorus levis*;
- 10 opcionalmente, en donde la placa de insectos pertenece a la especie *Bemisia tabaci*, *Bemisia argentifolii*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Hypothenemus hampei*, *Cosmopolites sordidus*, *Sphenophorus levis*, *Anthonomus grandis*, *Diaphorina citri*, *Helicoverpa armigera*, *Frankliniella occidentalis*, *Frankliniella schulzei*, *Thrips tabaci*, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, *Oligonychus ilicis*, *Planococcus citri*, *Mahanarva fimbriolata*, *Agriotes spp*, *Diabrotica spp* o *Daibulus maidis*, preferentemente, en donde la plaga de insectos es *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemípteros: *Aleyrodidae*).
- 15 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y 10-13, la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 y 10-13, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en donde dicha (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, y (b) uno o más germinantes se usan simultáneamente, por separado o secuencialmente, opcionalmente, en donde:
- 20 dicha (a) una o más esporas fúngicas de un agente biológico o agente de control biológico, y (b) uno o más germinantes se usan simultáneamente; y/o
- 25 (i) el uno o más germinantes comprenden o consisten en glicina betaína, y en donde la glicina betaína se aplica al suelo o al hospedador, planta o parte de una planta o está presente en la composición a una concentración de al menos el 0,001 %, 0,002 %, 0,003 %, 0,004 %, 0,005 %, 0,006 %, 0,007 %, 0,008 %, 0,009 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 % o el 5 %;
- 30 (ii) el uno o más germinantes comprenden o consisten en un extracto de levadura o levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos, y en donde el extracto de levadura o la levadura inactiva, paredes celulares de levadura, fracción de pared celular de levadura, producto de pared celular de levadura, o combinación de los mismos, se aplica al suelo o al hospedador, planta o parte de una planta o está presente en la composición a una concentración de al menos el 0,001 %, 0,002 %, 0,003 %, 0,004 %, 0,005 %, 0,006 %, 0,007 %, 0,008 %, 0,009 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 % o el 5 %; y/o
- 35 (iii) la una o más esporas fúngicas de un agente biológico o un agente de control biológico se aplican al suelo o al hospedador, planta o parte de una planta o están presentes en la composición a una concentración de al menos aproximadamente 1×10^6 , aproximadamente 1×10^7 , aproximadamente 1×10^8 , aproximadamente 1×10^9 , aproximadamente 1×10^{10} , aproximadamente 1×10^{11} o aproximadamente 1×10^{12} UFC/g.
- 40 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y 10-14, la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 8 y 10-14, o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-14, en donde:
- 45 (i) la planta o parte de una planta son cereales, maíz, arroz, pastos, caña de azúcar, plantas leguminosas, cultivo forrajero, plantas ricas en aceite y proteínas, cultivos de hortalizas, árboles frutales, cultivos de viticultura, cultivos urbanos o cultivos ornamentales;
- (ii) el uno o más germinantes comprenden o consisten en un extracto de levadura, y en donde el extracto de levadura es un extracto de levadura soluble; y/o
- 50 (iii) el uno o más germinantes comprenden o consisten en levadura inactiva, paredes celulares de levadura, una fracción de pared celular de levadura, un producto de pared celular de levadura, o una combinación de los mismos.



FF-1

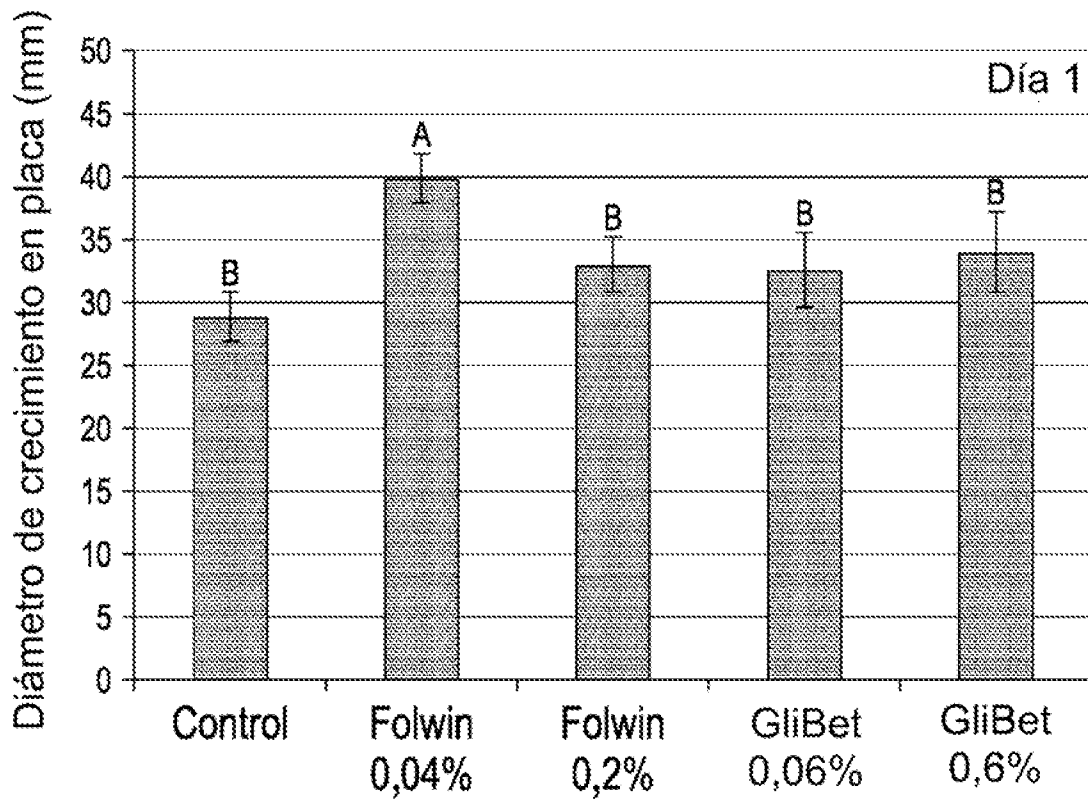


Figura 2a

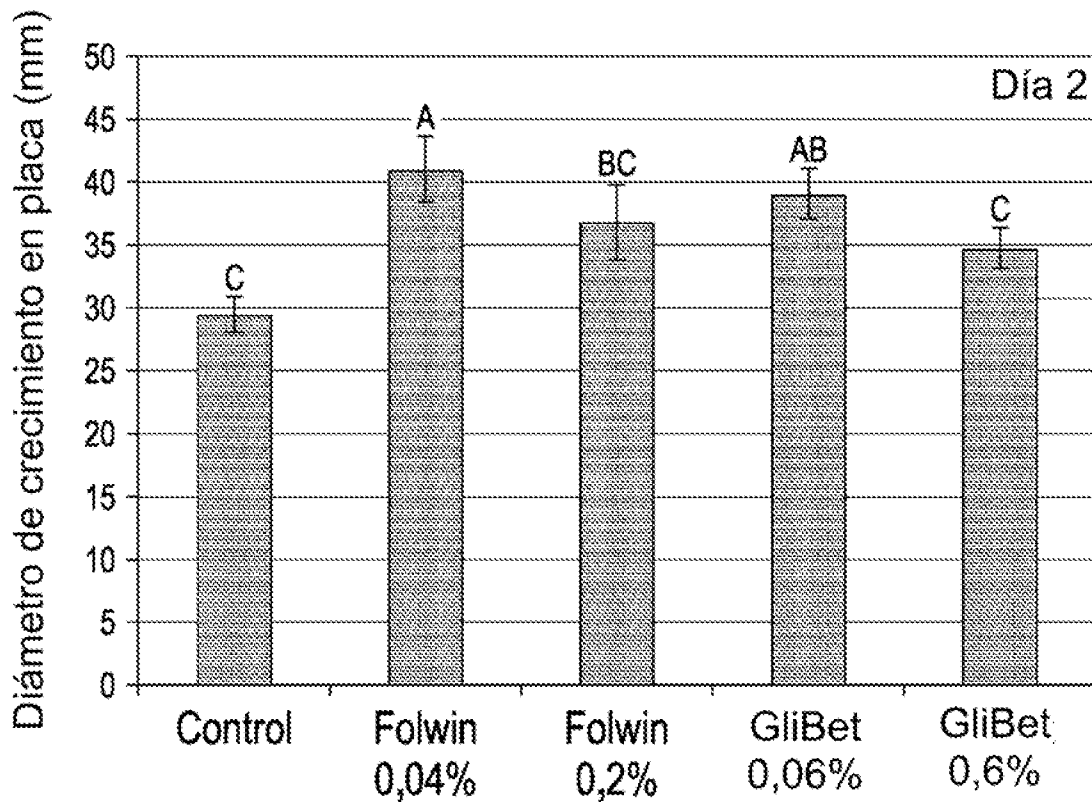
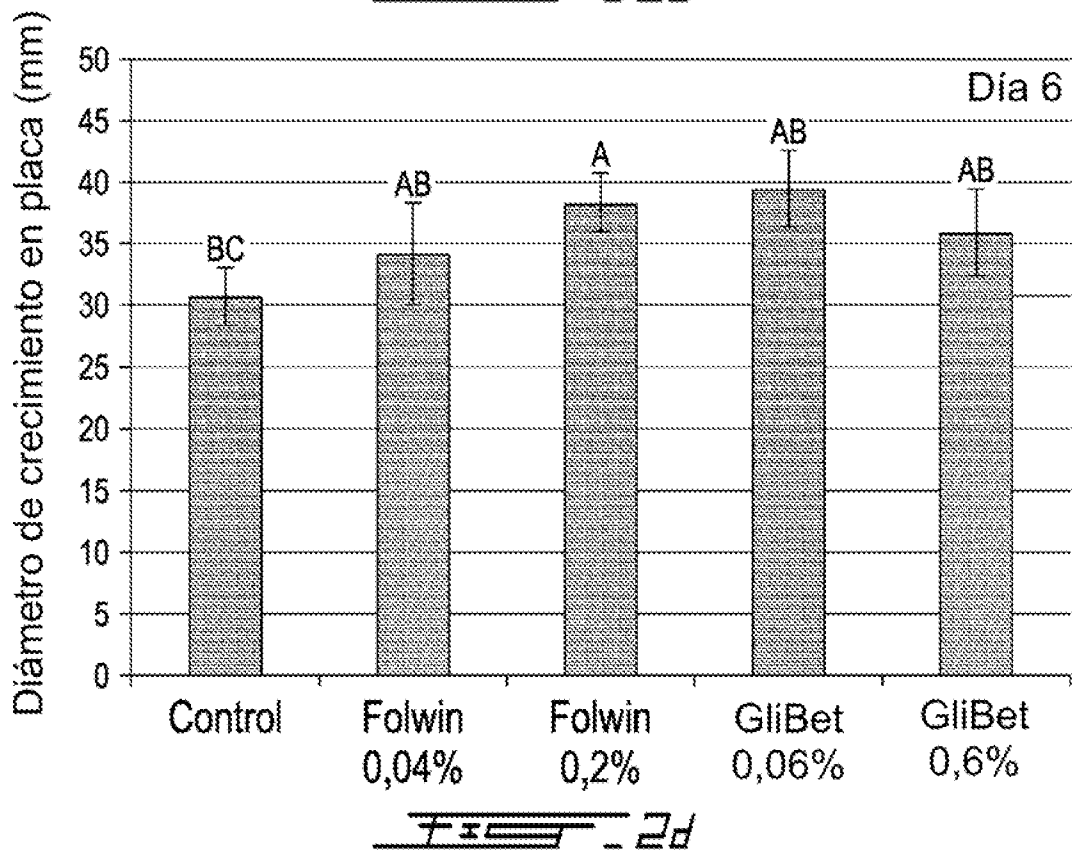
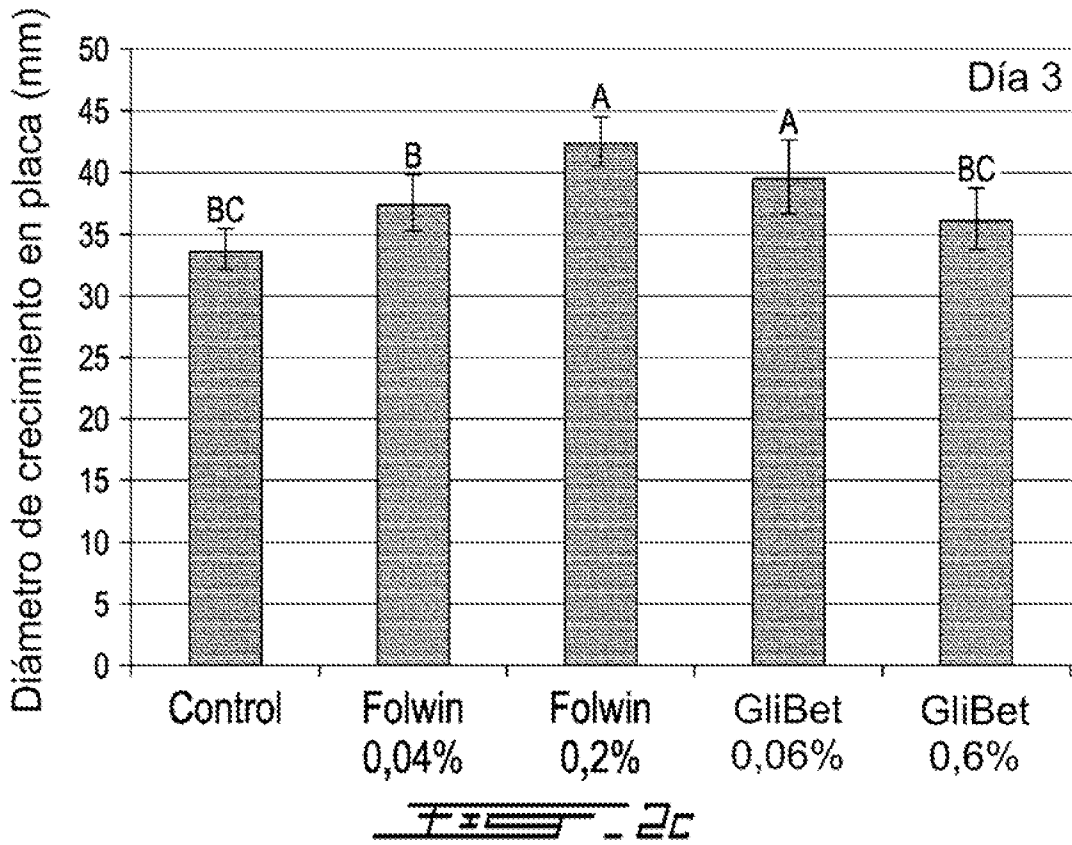


Figura 2b



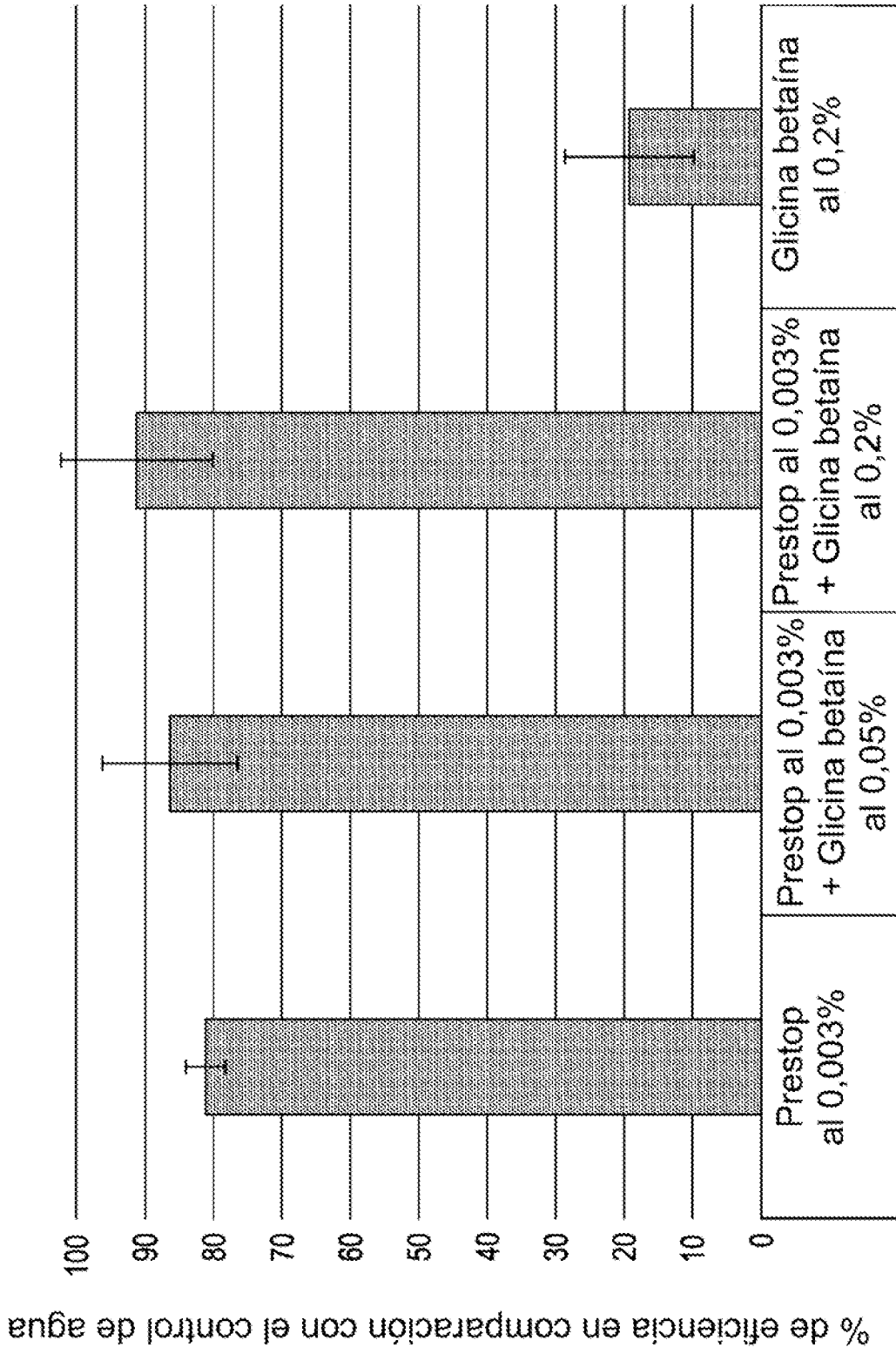


Fig. 3

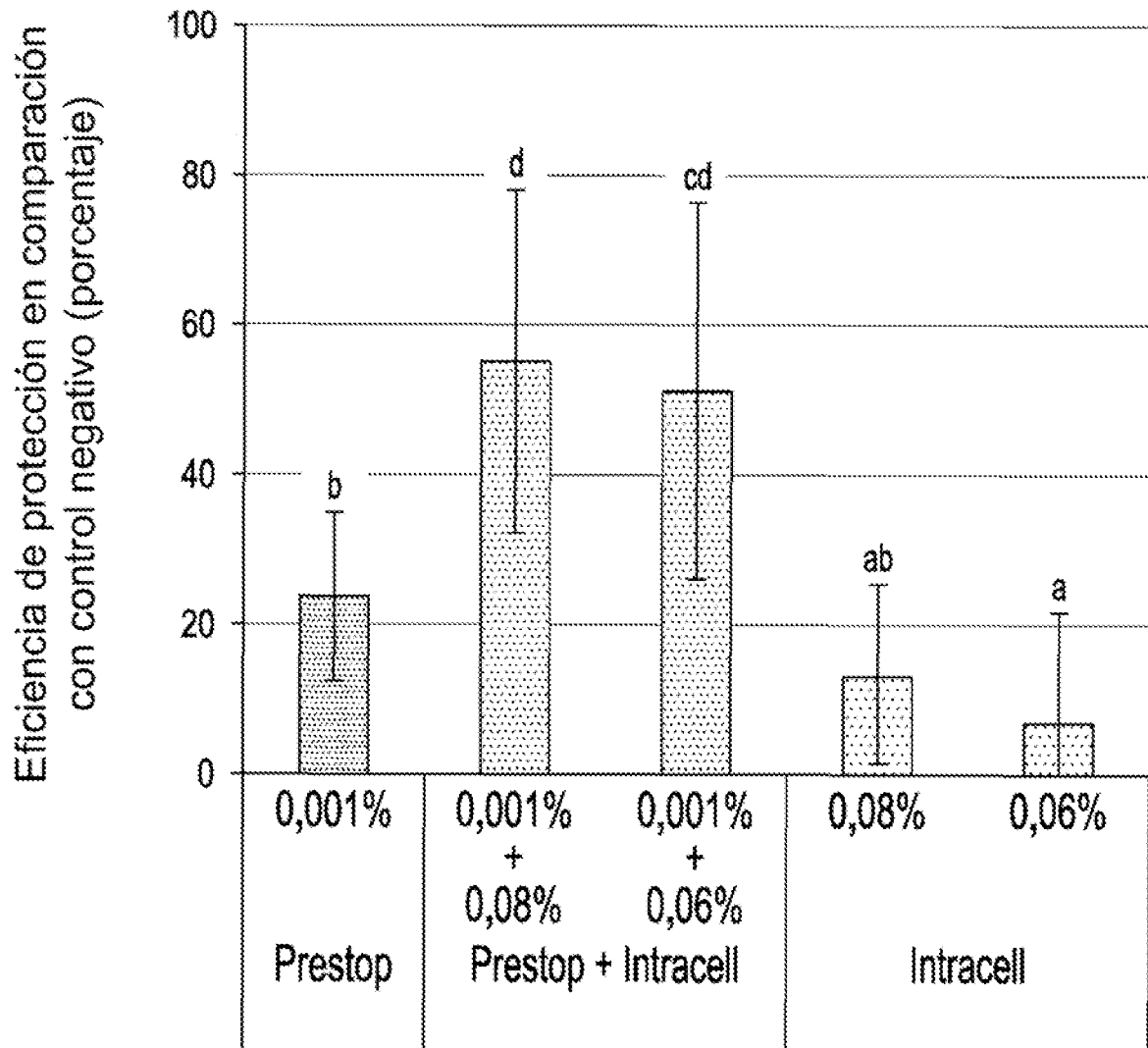


Fig. 4

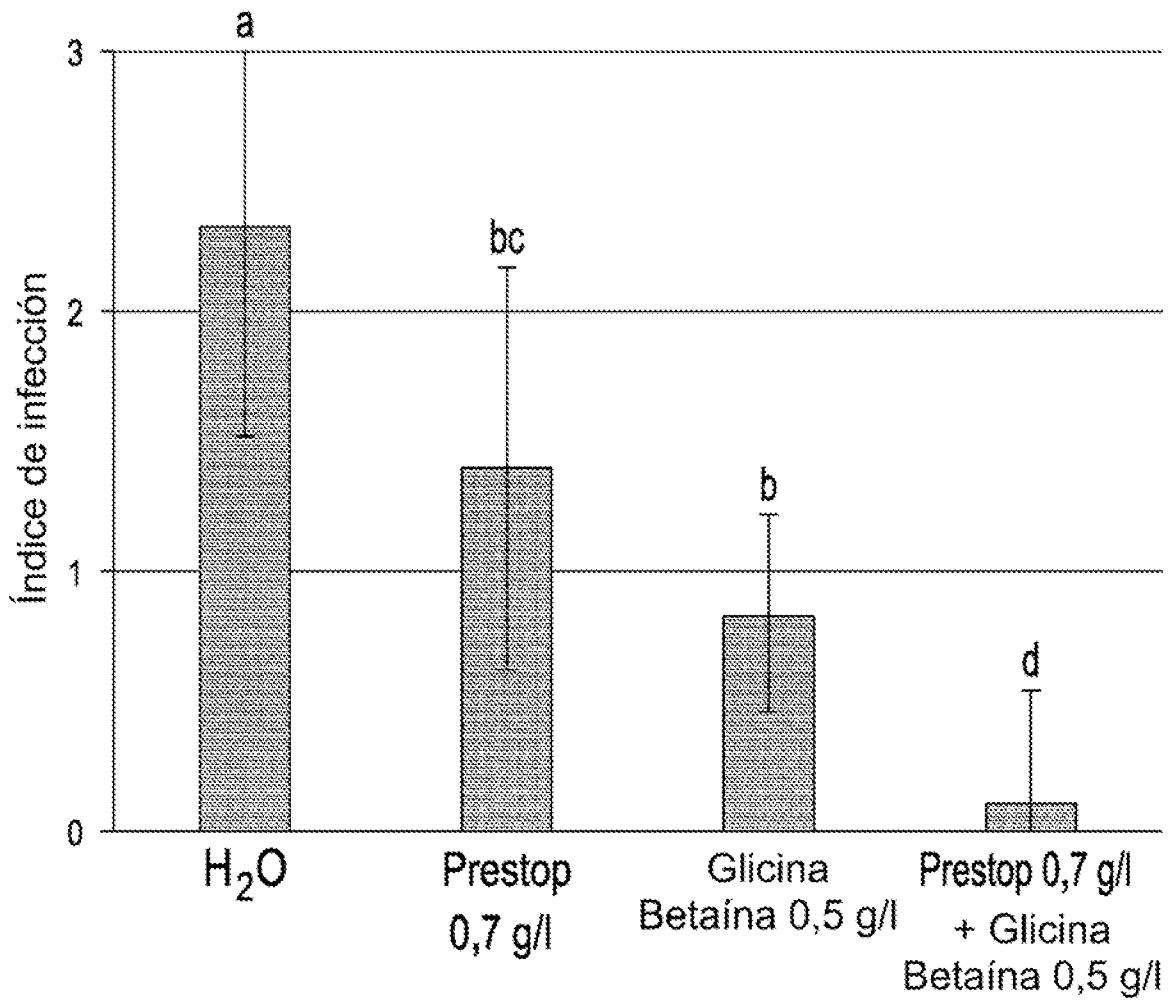


FIG. 5